



**Universidade Nova de Lisboa**

**Análise genética por RAPD de estirpes de *Schistosoma mansoni* com  
diferente susceptibilidade à infecção no hospedeiro definitivo**

Idalécia Laurinda Carlos Cossa Moiane

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM PARASITOLOGIA  
MÉDICA

(OUTUBRO, 2012)

**Universidade Nova de Lisboa**

**Análise genética por RAPD de estirpes de *Schistosoma mansoni* com  
diferente susceptibilidade à infecção no hospedeiro definitivo**

Idalécia Laurinda Carlos Cossa Moiane

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM PARASITOLOGIA  
MÉDICA

**Orientadora:** Inv.<sup>a</sup> Doutora Ana Afonso



**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Doutora Manuela Calado

Comissão tutorial

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à aquisição do grau de Mestre em Parasitologia Médica, realizada sob orientação científica da Inv.<sup>a</sup> Doutora Ana Afonso e Prof.<sup>a</sup> Doutora Manuela Calado.

(OUTUBRO, 2012)

Apresentação do Trabalho:

-  13º Congresso Internacional de Esquistosomose, 16 a 19 Setembro de 2012, Belo Horizonte, Minas Gerais-Brasil – Formato de poster
-  XIV Jornadas de Saúde de Moçambique, 17 a 21 de Setembro de 2012, Maputo-Moçambique – Formato de poster

“...a evolução pode parecer num sentido vago «coisa boa», especialmente porque nós somos um produto dela, na realidade não há nada que queira evoluir. A evolução é qualquer coisa que acontece, quer se queira quer não, apesar de todos os esforços dos replicadores (e, hoje em dia, dos genes) para evitar que ela aconteça.”

Richard Dawkins (em “O Gene Egoísta”, 1989, pág. 42)

## DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Miguel Manuel Moiane por tudo o quanto me tem proporcionado, pelo amor, companheirismo, paciência, sábias palavras em todos os momentos, todos os dias agradeço pelo facto de ter-te na minha vida, ter-te ao meu lado e ser o pilar que eu precisava para sustentar os meus sonhos e torná-los credíveis e realizáveis;

Ao meu irmão Euclides Roberto Carlos Cossa e esposa Elsa Ribeiro pelo apoio, disponibilidade, persistência que esta trajectória fosse percorrida da melhor forma possível;

Aos meus sogros Nhanchal Manuel Moiane e Belmira Nhapecane pelo incrível papel de pais que desempenham na minha vida, sem vossa determinação e coragem não chegaria a este nível, conseguiram preencher um grande vazio que sentia;

À memória da minha mãe, Filomena Manjate, tu foste, és e serás a minha inspiração para a batalha da vida, se pudesse ser metade da mãe/ mulher que foste, considerar-me-ia uma pessoa realizada.

## **AGRADECIMENTOS**

Os meus sinceros agradecimentos para todas as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado, em particular:

À minha orientadora Investigadora Ana Afonso pelos ensinamentos, apoio laboratorial, disponibilidade nos ensinamentos, apoio incansável na orientação do trabalho, esclarecimento de dúvidas e sobretudo pela amizade e simplicidade o que tornou esta grande maratona possível de vencer, muito obrigada!

À minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Doutora Manuela Calado, pelo apoio no incansável sempre que precisasse, apoio moral, compreensão, disponibilidade, amizade e simplicidade, muito obrigada!

Aos Professores Silvana Belo e Paulo Almeida pelo apoio na inscrição e direcção dos procedimentos académicos para que efectivamente pudesse realizar o Mestrado;

Ao Doutor Lester Chitsulo da área das Doenças Tropicais e Negligenciadas na OMS, Genebra, pelos conhecimentos transmitidos, apoio moral e confiança depositado em mim para que pudesse realizar o curso;

À Dra. Maria de Fátima Mangore e Dra. Benedita Silva do Ministério da Saúde, Moçambique, por terem confiado a minha estadia neste estabelecimento de ensino;

À técnica Isabel Clemente, pela disponibilidade, amizade e apoio na execução das técnicas, especialmente ao longo do estágio curricular;

Aos mestres Cátia Ferreira e Pedro Ferreira pelo apoio, amizade e disponibilidade científica;

Ao Tiago Mendes, pelo apoio incondicional em todos os momentos que precisei durante as práticas laboratoriais, pela amizade e consideração, o meu singelo obrigado;

À toda equipa da Unidade de Helminologia e Malacologia Médica pelo apoio científico, laboratorial e amizade;

À Professora Isabel Maurício pela disponibilidade, apoio laboratorial e científico;

À Vanessa Azevedo, pela amizade, apoio moral, o meu muito obrigado pelo carinho;

À Luiza Tonaco, pela amizade, carinho, apoio moral, convívios proporcionados e momentos académicos partilhados;

Aos meus colegas do XI Mestrado em Parasitologia Médica, pelos grandes momentos compartilhados a nível académico como social, pela amizade, carinho e tudo o quanto proporcionaram-me para que a distância da minha família não fosse difícil de gerir;

Aos meus tios, sem os quais com certeza não chegaria onde cheguei, Jamal Alufane e Rufina Silva e seus filhos pelos momentos graciosos e gratificantes, proporcionaram-me o ambiente familiar que de outro modo não teria;

À senhora Marta Mondlane, por tudo que me tens proporcionado, mesmo sem conhecer-me encarnaste num papel de mãe e amparas-me em todos os momentos quer felizes quer tristes, faltam-me palavras e gestos para poder exprimir a minha gratidão;

À comunidade da Paróquia do Nosso Senhor Jesus dos Navegantes, Paço d'Arcos-Oeiras, especialmente ao Padre Jaime e a senhora Maria Alcina Leitão, pelo carinho, amizade, conselhos, apoio e confiança depositada em mim;

A todas as pessoas que não mencionei e que de algum modo contribuíram para que este trabalho fosse possível, o meu muito obrigada.

## RESUMO

### Análise genética por RAPD de estirpes de *Schistosoma mansoni* com diferente susceptibilidade à infecção no hospedeiro definitivo

[Idalécia Laurinda Carlos Cossa Moiane]

**Palavras-chave:** RAPD, susceptibilidade, polimorfismo

A schistosomose é a segunda parasitose com maior impacto na Saúde Pública afectando mais de 200 milhões de pessoas que vivem em países subdesenvolvidos das regiões tropicais e subtropicais, sendo que 85% vivem em África. Trata-se de um complexo de infecções parasitárias crónicas e agudas, causadas por parasitas do género *Schistosoma*, sendo este grupo de parasitas habitantes dos vasos sanguíneos de mamíferos cuja distribuição geográfica e diversidade é superior a outros parasitas habitantes dos vasos sanguíneos.

Os parasitas causadores desta patologia, em particular a espécie *Schistosoma mansoni*, têm a capacidade de criar mecanismos de escape ao sistema imunológico do hospedeiro, o que leva a variações no seu perfil genético conforme o ambiente a que estejam expostos, implicando variabilidade genética evidenciada através de polimorfismos genéticos. Assim sendo, efectuou-se o presente estudo com o objectivo de efectuar uma análise genética de estirpes de *S. mansoni*, com diferente susceptibilidade à infecção no hospedeiro definitivo através da técnica molecular RAPD-PCR.

Para o efeito foram testados 10 marcadores RAPD, os dos quais apenas os OPI-7, OPI-12 e OPI-18 se mostraram mais eficientes para a análise de polimorfismos. Os vermes foram obtidos de murganhos normais *Mus musculus*, estirpe CD1, ER e a estirpe C57BL/6J dos quais foram obtidos os transgénicos  $J\alpha 18^{-/-}$  e TGF $\beta$ RIIdn (com deficiência em células iNKT e silenciamento dos receptores para TGF- $\beta$  respectivamente).

Cerca de 40% (4/10) dos *primers*, demonstraram um perfil genético diferente, tendo sido gerados um total de aproximadamente 437 fragmentos e um padrão de amplificação com fragmentos cujos pesos moleculares variaram entre os 200pb e os 2000pb. Ao comparar os perfis RAPD de vermes obtidos do murganho CD1 com os demais, observou-se que este distinguiu-se dos vermes obtidos de C57BL/6J,  $J\alpha 18^{-/-}$  e TGF $\beta$ RIIdn pela presença de três, um e seis fragmentos diferentes respectivamente. A análise de dendrograma demonstrou a existência de três agrupamentos distintos, o primeiro composto por vermes obtidos do murganho CD1 (apenas o verme fêmea), ambos sexos obtidos de murganhos da estirpe ER, C57BL/6J e  $J\alpha 18^{-/-}$ ; o segundo composto pela fêmea e macho de vermes de *S. mansoni* obtidos de murganhos TGF $\beta$ RIIdn e o terceiro obtidos de murganhos CD1 (apenas o macho).



A análise dos perfis RAPD, mostrou-se útil como ferramenta para estudo de perfis genéticos de vermes de *S. mansoni* infectando hospedeiros definitivos com diferente padrão genético. Por outro lado, os perfis polimórficos identificados no presente estudo sugerem que o sistema imune do hospedeiro é capaz de induzir à pressão selectiva do parasita o qual pode ser observado através da análise de polimorfismos.

## ABSTRACT

### Genetic analysis by RAPD of *Schistosoma mansoni* strains with different susceptibility to the definitive host

[Idalécia Laurinda Carlos Cossa Moiane]

**Keywords:** RAPD, susceptibility, band polymorphism

The schistosomiasis is the second largest parasitic disease with impact on public health affecting more than 200 million people living in underdeveloped countries of tropical and subtropical regions, where 85% live in Africa. Is a complex of acute and chronic parasitic infections, caused by parasites of the genus *Schistosoma*, group of parasites population whose habitat is the blood vascular system of mammals has higher geographical distribution and diversity than other parasite population of blood vascular system.

The parasites causing this disease, in particular *Schistosoma mansoni*, can create escape mechanisms to the host immune system, leading to variations in their DNA profile to the environment as they are exposed, resulting in genetic variability evidenced by genetic polymorphisms. The aim of this study was to assess whether different susceptibility to infection in definitive hosts, can produce genetic polymorphic profiles using a RAPD-PCR.

For this purpose 10 primers were used for RAPD-PCR screening, of them, one, OPI-5 was not functional and the OPI-7, OPI-12 and OPI-18 where more efficient for the analysis of polymorphisms. Worms were collected from *Mus musculus* strain CD1, resistant and non-resistant to Praziquantel (strain BH) and from C57BL/6J,  $J\alpha 18^{-/-}$ , TGF $\beta$ RIIdn mice both infected with *S. mansoni* (strain BH). Worms were collected and genomic DNA was extracted from each corresponding mice strain.

About 40% (4/10) of the RAPD-PCR primers used presented different genetic profiles, generating 437 fragments and pattern amplifications whose molecular weights were between 200pb and 2000pb. For *S. mansoni* infecting C57BL/6J mice, the RAPD-PCR profile showed three different bands from the *S. mansoni* infecting CD1 mice profile. For *S. mansoni* infecting  $J\alpha 18^{-/-}$  mice the RAPD-PCR profile showed one different band from the *S. mansoni* infecting CD1 mice profile. For *S. mansoni* infecting TGF $\beta$ RIIdn mice the RAPD-PCR profile showed six different bands from the *S. mansoni* infecting CD1 mice profile. The genetic similarity analysis, demonstrate the existence of three distinct clusters, one with *S. mansoni* infecting CD1 (only a female), female and male infecting ER, C57BL/6J and  $J\alpha 18^{-/-}$ ; second cluster with female and male of *S. mansoni* infecting a TGF $\beta$ RIIdn mice and third male infecting a CD1 mice.

The RAPD-PCR analyzes, showed to be a very useful toll in genetic profiling *S. mansoni* infecting hosts with different genetic backgrounds and polymorphic profiles identified in this study suggest that the host immune system induce a selective pressure on the parasite genetic profile.

## ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS .....	vi
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	1
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
1.1 Nota Introdutória .....	4
1.2 Breves dados históricos sobre a schistosomose.....	5
1.3 Epidemiologia da doença.....	6
1.4 Taxonomia.....	8
1.5 Morfologia.....	8
1.6 Hospedeiros Intermediários.....	10
1.7 O parasita.....	11
1.7.1 Distribuição mundial.....	11
1.7.2 O genoma .....	12
1.7.3 Ciclo de vida.....	13
1.7.4 Resistência ao parasitismo .....	15
1.7.5 Patologia.....	17
1.7.6 Diagnóstico.....	18
1.7.7 Prevenção e controlo .....	19
1.7.8 Tratamento .....	20
1.8 Ferramentas moleculares aplicadas ao estudo de <i>S. mansoni</i> .....	21
1.9 Objectivos.....	23

<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
2.1 Obtenção do material biológico.....	25
2.1.1 Modelo animal.....	25
2.1.2 Confirmação e quantificação da infecção .....	27
2.2 Análise molecular .....	27
2.2.1 Extração do ADN genómico.....	27
2.2.2 Condições de amplificação do ADN genómico .....	28
2.2.3 Marcadores RAPD-PCR .....	28
2.3 Análise dos perfis electroforéticos .....	30
<b>3. RESULTADOS</b> .....	31
3.1 Análise molecular .....	32
3.1.1 Amplificação do AND genómico.....	32
3.1.2 Análise genética por RAPD-PCR.....	32
3.1.2.1 Marcadores RAPD.....	32
3.1.2.2 Nível de amplificação.....	33
3.1.2.3 Perfil de amplificação.....	33
3.2 Análise genética de estirpes de <i>S. mansoni</i> .....	34
3.2.1 Análise dos fragmentos obtidos.....	35
3.2.2 Identificação de polimorfismos.....	38
3.2.3 Similaridade (ou distância) genética entre as estirpes de <i>S. mansoni</i> .....	38
<b>4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b> .....	40
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49

LISTA DE FIGURAS .....	570
LISTA DE TABELAS .....	581
ANEXOS.....	592

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A.C</b>	Antes de Cristo
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>CTAB</b>	Brometo de hexadeciltrimetilamônio- <i>Cetyl trimethylammonium bromide</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético- <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático- <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>Foxp3</b>	Caixa <i>forkhead</i> P3- <i>Forkhead box P3</i>
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IHMT</b>	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
<b>iNKT</b>	Células T <i>natural killer</i> invariantes
<b>ITS</b>	Transcrição da Região Interna- <i>Internal Transcribed Spacer</i>
<b>LB</b>	Luria-Bertani (meio de cultura)
<b>NKT</b>	Células T natural killer
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reacção em Cadeia da Polimerase- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PZQ</b>	Praziquantel
<b>RAPD</b>	Amplificação arbitrária de ADN polimórfico- <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA- <i>Tris-acetate-EDTA</i>

**TCR** Receptor das células T

**TE** Tris-EDTA

**TGF- $\beta$**  Factor de Transformação de Crescimento-*Transforming growth factor beta*

**Th1 e Th2** Subpopulações de linfócitos T diferenciadas pelas suas capacidades em produzir citocinas (*T helper 1, T helper 2*)

**T4 PNK** T4 Polinucleotídeo Cinase- *T4 Polynucleotide Kinase*

**UEIP** Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia



## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 Nota Introdutória

A schistosomose também conhecida como bilharziose, é uma doença parasitária causada por parasitas do género *Schistosoma* que assim como a Malária e a Tuberculose, lideram nas causas de morbilidade na população humana que vive nas regiões tropical e subtropical. Estes parasitas circulam nos vasos sanguíneos do hospedeiro definitivo, são dióicos e apresentam um ciclo de vida complexo com fenótipos morfologicamente distintos no hospedeiro definitivo e intermediário (Berriman et al, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2010), mais de 207 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo sendo a maioria pertencente a comunidades pobres, sem acesso à água potável e adequado saneamento do meio e destas, 85% vivem no continente Africano. Estima-se que 700 milhões de pessoas em todo o mundo podem estar em risco de se infectar se as suas actividades agrícolas, domésticas ou de lazer continuarem a expô-las à água.

Os parasitas do género *Schistosoma*, são conhecidos como organismos que exibem múltiplas variações dentro da mesma espécie, estirpe e género, no que diz respeito aos níveis de infectividade, patogenicidade e imunogenicidade (Gentile & Oliveira, 2008; Steinauer et al., 2008). Estes factores, podem ser diferentes entre populações de parasitas conforme as condições epidemiológicas locais a que estão expostas. Variações observadas em *Schistosoma mansoni* de diferentes regiões geográficas ou em indivíduos da mesma região podem ser determinadas por diferenças no genótipo de cada estirpe de parasita (Tran et al., 2006; Gentile & Oliveira, 2008, Standley et al., 2012a; Standley et al., 2012b).

Por outro lado, estudos de biologia molecular têm vindo a confirmar as diferenças e semelhanças entre estirpes geográficas de *S. mansoni* no Brasil e outras áreas endémicas do globo. Diferenças significantes também foram relatadas entre aspectos clínicos de *S. japonicum* na China e *S. japonicum* nas Filipinas (King, 2011).

Segundo Cook & Zumla (2003), a técnica de amplificação polimórfica arbitrária da cadeia do ácido desoxirribonucleico (ADN), RAPD é uma técnica baseada na reacção em cadeia da polimerase, a PCR cujos marcadores foram aplicados em vários estudos na

identificação de polimorfismos. Lee (2010) refere alguns estudos realizados aplicando esta técnica em que foi possível identificar estirpes e espécies não apenas do género *Schistosoma*, assim como, de outros organismos, inclusive bactérias, onde neste último a técnica mostrou-se aplicável na rápida identificação de isolados de microorganismos em alimentos apresentando o perfil do género, espécie ou estirpe específica em um estudo conduzido com *Bacillus cereus*.

## **1.2 Breves dados históricos sobre a schistosomose**

Os ovos de parasitas do género *Schistosoma*, especificamente *Schistosoma mansoni*, foram encontrados pela primeira vez em múmias chinesas com mais de dois mil anos e os aspectos clínicos causados por este parasita, foram descritos pela primeira vez em 1847, pelo japonês Fuji (Katz & Almeida, 2003).

Em 1851, o patologista Alemão, Theodor Maximilian Bilharz, no Egipto descreveu um parasita intravascular durante a necropsia de um rapaz, tendo denominado tal parasita de *Distomum haematobium*. Posteriormente, em 1958, Weinland propôs o nome de *Schistosoma* que em grego significa “corpo dividido”, devido a morfologia dos vermes machos (Neves et al., 2004).

Hoje, sabe-se que existem muitas espécies de parasitas do género *Schistosoma*, porém só algumas apresentam importância médica e veterinária (Webster et al., 2007), porém apenas cinco são responsáveis por liderar a proporção de infecções nos seres humanos: *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. mekongi*, sendo as três primeiras as mais importantes (Cook & Zumla, 2003).

O ciclo evolutivo do parasita *S. mansoni* foi estudado, e em 1913 foi descrito o hospedeiro intermediário, moluscos do género *Biomphalaria* com concha espiral plana, que podem medir de 10 a 40 mm. Esta descrição foi feita por Miyaki e Suzuki, que também demonstraram que a cercária era a forma do parasita responsável pela transmissão da doença ao homem através da sua penetração activa pela pele deste (Katz & Dias, 1999; Katz & Almeida, 2003).

### 1.3 Epidemiologia da doença

A schistosomose é uma doença tropical negligenciada causada por parasitas do género *Schistosoma*, que apesar de vários esforços no seu controlo, afecta mais de 200 milhões de pessoas em 76 países distribuídos nas regiões tropical e subtropical (figura 1), sendo a patologia mais prevalente nesses países e com elevadas taxas de morbilidade e mortalidade depois da malária (King, 2011).



**Figura 1:** Distribuição mundial da Schistosomose (Adaptado Belo, 2011)

O peso desta patologia é disputado (Murray & Lopez, 1996) com a malária, porque as estimativas reais não consideram os sintomas, complicações e fase crónica da schistosomose (Chistulo, Loverde & Engels, 2004). Segundo o Comité de Especialistas da Organização Mundial de Saúde, OMS (2002), estima-se que ocorram mais de 200 000 mortes anuais em relação às 15 000 que eram reportadas até aquela altura (WHO, 2002). Uma análise feita para esta discrepância foi apresentado por Mihaud, Gordon e Reich (dados não publicados), onde referem que esta deve-se ao facto da schistosomose ser uma patologia subestimada o que a deixa apenas no segundo lugar em relação a malária no

universo das doenças tropicais como causa de morbidade (Chitsulo, Loverde & Engels, 2004).

Estima-se que, aproximadamente 280 000 mortes por ano ocorram apenas na África subsaariana, embora a doença já tenha sido muito bem estudada, conhecendo-se claramente a sua cronicidade e morbilidade (Berriman et al., 2009). Segundo King (2011), a schistosomose está associada aos casos de disfunção renal e da bexiga (*S. haematobium*) reportados, ou a patologias intestinais e do fígado (*S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. mekongi*) em áreas endémicas, e também contribui para os casos de anemia e de atraso do crescimento.

Para King (2001) e Steinmann et al. (2006), a distribuição das diferentes espécies de *Schistosoma* está totalmente dependente da distribuição das espécies de moluscos específicos que actuam como hospedeiros intermediários. O clima, a qualidade da água assim como, outros aspectos ecológicos contribuem para a manutenção da população de moluscos determinando a distribuição da doença a nível distrital e nacional nos países afectados.

Em áreas endémicas, as infecções por este parasita são adquiridas logo na infância, e alguns estudos citados por King (2011), sobre a associação existente entre a idade e a intensidade de infecção em algumas áreas endémicas para *S. haematobium*, demonstraram que com a idade as infecções aumentam em prevalência e intensidade, registando-se um pico na faixa dos 15 aos 20 anos de idade e que existe um drástico declínio da intensidade mas não da prevalência na população adulta (Cook & Zumla, 2003; Rey, 2010).

As infecções nas populações humanas das áreas endémicas, seguem um padrão bastante disperso, em que as pessoas mais infectadas apresentam uma baixa contagem de ovos e uma pequena percentagem, entre 1-5%, com infecções extremamente pesadas (Cook & Zumla, 2003; Rey, 2010).

## 1.4 Taxonomia

A taxonomia das espécies com importância em medicina humana é a seguinte (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>):

Reino: Animalia

Filo: Platyhelminthes

Classe: Trematoda

Subclasse: Digenea

Ordem: Strigeidida

Família: Schistosomatidae

Género: *Schistosoma*

Espécies:

*Schistosoma haematobium* Bilhartz, 1852

*Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904

*Schistosoma mansoni* Sambon, 1907

*Schistosoma intercalatum* Fischer, 1934

*Schistosoma mekongi* Voge, Brickner & Bruce, 1978

**Figura 2:** Taxonomia *Schistosoma* sp

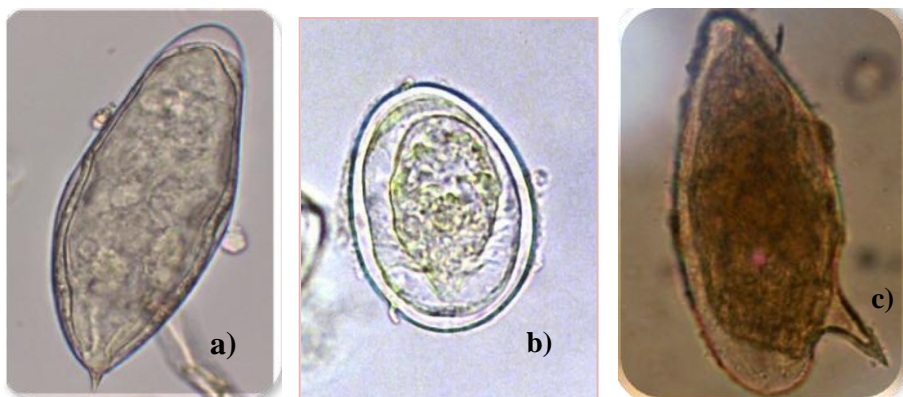
## 1.5 Morfologia

O género *Schistosoma* tal como foi referido anteriormente, é um digenético completamente adaptado ao parasitismo (Combes, 1990; Rey, 2010). Contrariamente à generalidade dos trematódes, este género de parasitas apresenta-se como vermes dióicos, isto é, com os sexos separados; acentuado dimorfismo sexual, vivem no interior dos vasos sanguíneos de mamíferos (Rey, 2010).

As diferentes formas que podem adquirir ao longo do seu ciclo de vida são comuns para todas as espécies deste género, apresentando as formas de ovo (com diferente

morfologia conforme a espécie), miracídio, esporocisto, cercária, schistosômulo e vermes adultos cuja dimensão corporal varia de acordo com a espécie e sexo em causa, (Chiodini, Moody & Manser, 2001; Rey, 2010).

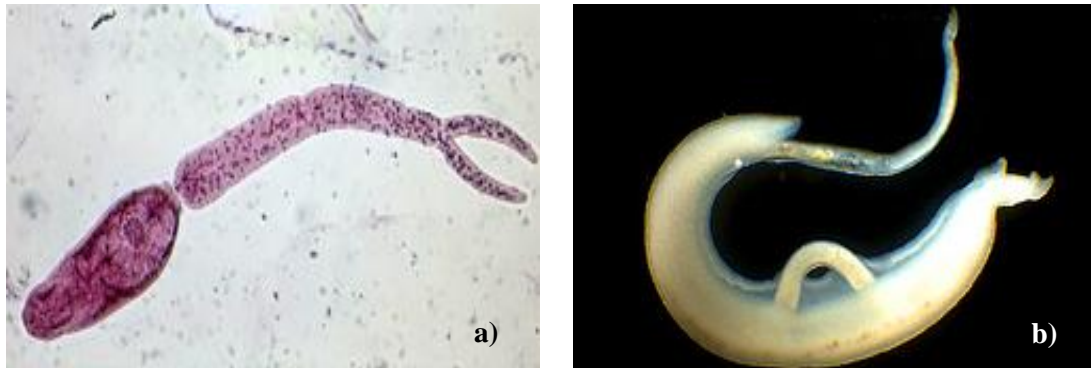
Os ovos não são operculados, contêm no seu interior o miracídio (ou *miracidium*) que se desenvolve por um período de aproximadamente 16 dias (Davis, 2003). Apresentam um espinho, também designado de esporão, cuja posição permite distinguir as diferentes espécies do género *Schistosoma* (Figura 3) (Chiodini, Mody & Manser, 2001; Rey, 2010).



**Figura 3:** Morfologia dos ovos de *Schistosoma* sp **a)** *S. haematobium* esporão na posição terminal (original, Idalécia Moiane). **b)** *S. japonicum* esporão rudimentar (fonte: Belo, 2011). **c)** *S. mansoni* esporão na posição lateral (original, Idalécia Moiane)

As cercárias constituem a forma infectante para os hospedeiros definitivos, apresentam cauda bifurcada e corpo cercariano, que diferem em pequena escala de espécie para espécie dentro do género *Schistosoma* (Figura 4a). Estas formas apresentam duas ventosas, uma oral e outra ventral, é principalmente através da ventosa ventral que fixa-se na pele do hospedeiro no processo de penetração. A cauda não apresenta órgãos definitivos uma vez que ao penetrar no hospedeiro esta irá se desagregar do resto do corpo da cercária, o que significa que a mesma só apresenta função locomotora quando esta ainda se encontra em meio líquido (Neves et al., 2004; Rey, 2010).

Os vermes adultos vivem acasalados nos vasos sanguíneos (Figura 4b), o macho mede cerca de 1cm, tem cor esbranquiçada com tegumento recoberto por pequenas projecções, os tubérculos (Neves et al., 2004; Rey, 2010).



**Figura 4:** Morfologia das formas larvares e adultas de *Schistosoma* sp **a)** Cercária. **b)** Vermes adultos (fêmea no canal ginecóforo do macho) (fonte: <http://www.nhm.ac.uk>)

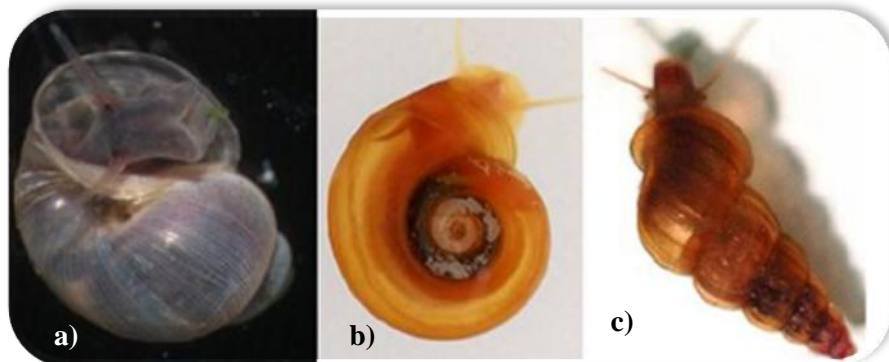
O corpo é dividido em duas porções, uma anterior com ventosa oral e ventral e posterior (inicia-se logo após a ventosa ventral), onde é encontrado o canal ginecóforo (Figura 4b). A fêmea mede cerca de 1.5cm, é delgada e lisa em toda a sua extensão, apresenta uma cor mais escura devido ao ceco com sangue semi-digerido (Neves et al., 2004; Rey, 2010).

## 1.6 Hospedeiros Intermediários

Os parasitas do género *Schistosoma* apresentam uma grande complexidade no seu ciclo de vida, sendo o elevado grau de especificidade uma importante característica para a interacção molusco-digenea. A distribuição geográfica das espécies de *Schistosoma* está associada a existência de hospedeiros intermediários susceptíveis a infecção. Os hospedeiros intermediários para este grupo de parasitas são moluscos pertencentes à Classe Gastropoda e subclasse Pulmonata. São essencialmente moluscos de água doce e não apresentam opérculo. Os pulmonados aquáticos distinguem-se dos terrestres por disporem de apenas um par de tentáculos não retrácteis, os olhos são sésseis e situam-se na base desses órgãos (Rey, 2010).



A família Planorbidae é a mais importante sob o ponto de vista médico, pois inclui moluscos hospedeiros de *S. mansoni* e *S. haematobium*, pertencentes aos gêneros *Biomphalaria* e *Bulinus*, respectivamente (Figura 5 a) e 5 b). O molusco hospedeiro intermediário de *S. japonicum*, é um molusco de água doce anfíbio que pertence à família Hydrobiidae, gênero *Oncomelania* (Figura 5 c) (Chiodini, Moody & Manser, 2001; Katz & Almeida; 2003; Rey, 2010).



**Figura 5:** Moluscos hospedeiros intermediários, morfologia das conchas a) *Bulinus* sp b) *Biomphalaria* sp c) *Oncomelania* sp (fonte: <http://englishclass.jp/reading/topic/Bulinus>)

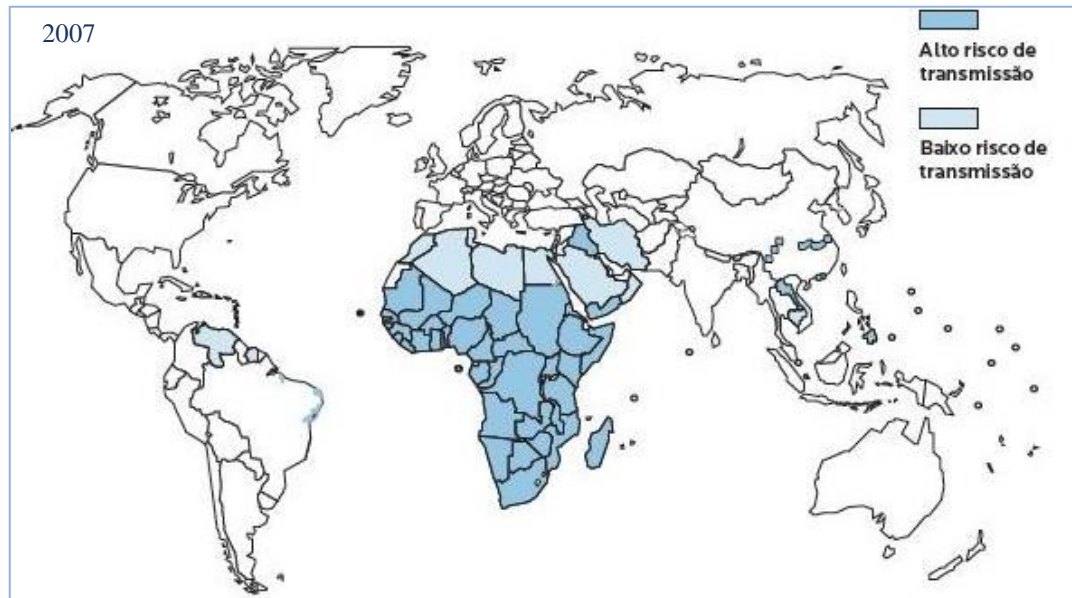
O gênero *Biomphalaria* (Preston, 1920) é o mais importante para a Saúde Pública, não apenas por ser vector da schistosomose mansônica mas também por se encontrar amplamente distribuída entre África e Sul da América. As espécies *Biomphalaria glabrata* na região Neotropical, a *B. pfeifferi*, a *B. alexandrina* e *B. sudanica* em África, Madagascar e Médio Oriente, foram reconhecidas como as espécies mais importantes no ciclo transmissão natural da schistosomose à população humana (Morgan et al., 2003).

## 1.7 O parasita

### 1.7.1 Distribuição mundial

A espécie *S. mansoni* é encontrada em cerca de 55 países distribuídos entre África, Médio Oriente, Caribe e América do Sul (Figura 6). A alta prevalência da doença causada por este parasita, é observada na região do Vale do Nilo, em particular nos países vizinhos

nomeadamente, o Sudão e Egipto. No Novo Mundo, a infecção ocorre no Brasil, Suriname, Venezuela e várias ilhas no Caribe (Cook & Zumla, 2003; King, 2011).



**Figura 6:** Risco de transmissão da schistosomose (Silva et al., 2011)

Afecta cerca de 57 milhões de pessoas a viver nessas regiões e estes parasitas, têm como hospedeiro intermediário moluscos do género *Biomphalaria* (Neves et al., 2004; King, 2011). Em 40 países, sobretudo no continente Africano, ocorrem de forma endémica, múltiplas infecções entre *S. mansoni* e *S. haematobium* (Cook & Zumla, 2003).

### 1.7.2 O genoma

Desde 1994 que a OMS tem vindo a alertar para novos estudos e novas técnicas de diagnóstico, nomeadamente para o estudo do genoma do *S. mansoni* com o objectivo de identificar novos alvos que permitam o desenvolvimento de novos fármacos ou candidatos a vacina, de compreender a base molecular do metabolismo do parasita, e desenvolver e determinar a variação biológica do parasita, não apenas para *S. mansoni* mas também para *S. japonicum* (Franco et al., 2000).

Porém, mesmo antes desta iniciativa, estudos e o interesse pelo genoma de *S. mansoni* datam de algum tempo atrás, tendo sido descrito apela primeira por Short, Menzel

& Pathak em 1960, a estrutura dos cromossomas deste parasita. Foi observado pelos autores que este parasita apresenta um genoma diplóide constituído por 7 pares de autossomas e um de cromossomas sexuais, a fêmea é heterogamética possuindo o par de cromossomas ZW e o macho homogamético com o par ZZ. Estes resultados também foram observados em 1982, por Simpson, Sher, & McCutchan, ao isolarem o ADN de cercárias e vermes e por Berriman et al. (2009), e observado que de facto estes possuíam 8 pares de cromossomas, sendo 7 autossomas e 1 sexual.

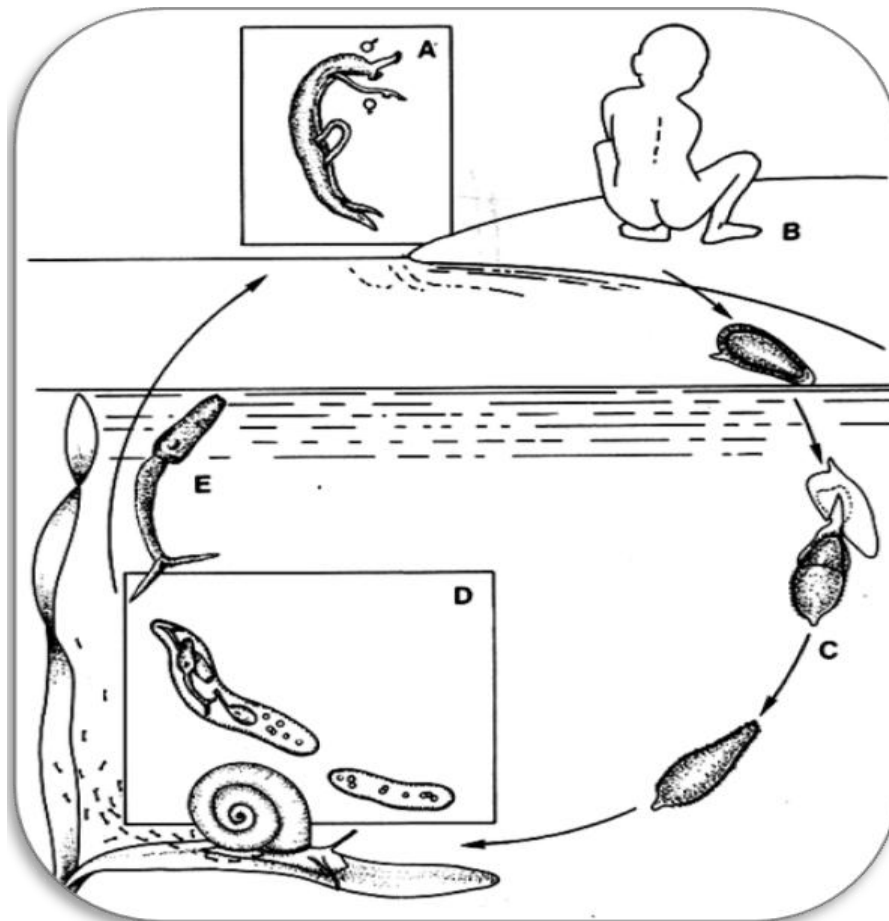
O tamanho do genoma haplóide, é de aproximadamente  $2,7 \times 10^8$  pb, consistindo em cerca de 4-8% de sequências de ADN altamente repetitivas (mais de 1000 cópias), 35-40% de sequências de ADN de repetibilidade média (aproximadamente 100 cópias) e o restante das sequências de cópia única (Simpson, Sher & McCutchan, 1982). O genoma haplóide, apresenta um conteúdo de A+T (Adenina e Timina) muito elevado, cerca de 60% (Hillyer, 1974), cujo índice deste conteúdo varia conforme o tipo de região, se for da região codificadora é de 60% e para a região não codificadora fica em torno de 70% (Meadows & Simpson, 1989; Milhon & Tracy, 1995).

Os cromossomas, apresentam tamanhos diferentes entre 18 a 73 Mb e podem ser distinguidos pelo tamanho, forma e bandas, embora o Projecto para o estudo do genoma deste parasita ainda estejam em curso, sabe-se que o genoma nuclear tem 363Mb de comprimento e codifica pelo menos 11 809 genes (Berriman et al., 2009). Tendo em consideração o tamanho do seu genoma e posição evolutiva, calcula-se que o *S. mansoni* tenha entre 15 000 a 20 000 genes expressos (Ali et al., 1991).

### **1.7.3 Ciclo de vida**

O ciclo do *Schistosoma mansoni* ocorre em dois hospedeiros, um vertebrado mamífero como hospedeiro definitivo e um molusco do género *Biomphalaria* como hospedeiro intermediário (Figura 7).

Os vermes adultos acasalados e no interior das vénulas da parede intestinal do homem e de outros mamíferos, depositam os seus ovos os quais depois de atravessarem a mucosa intestinal são eliminados para o ambiente juntamente com as fezes (Figura 7 A-B). No ambiente, ao alcançarem coleções de água doce superficial, os ovos eclodem e libertam as suas larvas - os miracídios - que nadam durante algum tempo até encontrarem moluscos do género *Biomphalaria* (Ortega et al., 2010).



**Figura 7:**Ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*. **A**, casal de vermes. **B**, eliminação dos ovos através das fezes. **C**, eclosão do ovo. **D**, penetração dos miracídios no molusco. **E**, libertação de cercárias (Adaptado de Rey, 2010)

No interior do molusco, cada miracídio transforma-se em esporocisto primário que por poliembrionia, dá origem a esporocistos filhos que por sua vez formam no seu interior as cercárias (Figura 7 D-E). Dependendo da temperatura da água e luz do meio, as cercárias abandonam o molusco e nadam quase sempre em direcção à superfície até que

tenham oportunidade de entrar em contacto com a pele de algum hospedeiro vertebrado susceptível onde poderão completar o desenvolvimento (Rey, 2010).

A cercária penetra activamente através da pele, e ao vencer esta barreira perde a cauda, torna-se alongada e seu tegumento modifica-se, passando a designar-se schistosômulos, os quais resistem à acção lítica do meio. Estes entram na circulação geral, passam pelo sistema circulatório e deste modo migram pelos pulmões, coração e fígado (Ortega et al., 2010). O seu crescimento no interior do hospedeiro definitivo é imediato assim que consiga sobreviver a acção do sistema imune do mesmo, onde ao final de 28-30 dias após a infecção já estão transformados em vermes adultos (Rey, 2010).

Para que completem o seu desenvolvimento, os schistosômulos deverão alcançar o sistema porta hepático, onde se transformam em vermes adultos, diferenciados em macho e fêmea ficam permanentemente acasalados. A fêmea, depois de fecundada, começa a depositar os seus ovos, aproximadamente 35 dias após a infecção. A circulação nesses vasos chega a ficar comprometida e o casal de vermes nessa altura desloca-se para outras áreas vasculares onde o mesmo processo se repete sucessivamente (Rey, 2010).

#### **1.7.4 Resistência ao parasitismo**

A resistência ao parasitismo, pode ser observada na pele e no processo de migração. A pele, constitui a primeira barreira do corpo humano que tem o papel de evitar a penetração do parasita, e como tal, neste órgão grande número de cercárias e schistosômulos tanto em hospedeiros imunes, como, em hospedeiros reinfetados são destruídos. Os schistosômulos que sobrevivem, efectuem a sua migração pelos órgãos internos do hospedeiro, apresentam diversas localizações (que podem decorrer de forma accidental) podendo ser destruídos ao longo do seu percurso pelos respectivos órgãos por onde se alojam ou transitam (Abe, 1991; Manzella et al., 2008; Rey, 2010)

Evidências de que factores imunitários do hospedeiro podem influenciar no desenvolvimento de *Schistosoma*, foram apresentadas pela primeira vez por Coker (1957) ao demonstrar que, contrariamente às expectativas, a administração de doses imunossupressoras de corticosteróides em ratinhos infectados com este agente inibem o

estabelecimento do mesmo; mesmos resultados também foram observados por *Weinmann & Hunter* (1960), embora para os dois estudos não tenha sido possível discriminar o efeito directo dos esteróides no parasita e um efeito indirecto mediado pelo sistema imune (Davies & McKerrow, 2003).

Para Rey (2010), a eficácia dos mecanismos de defesa do hospedeiro é compensada em certa medida por alguns dispositivos de escape próprios do *Schistosoma*, tais como: alteração do tegumento das larvas que em algum tempo depois de formados, deixam de fixar anticorpos ou complemento, contínua descamação da superfície externa do tegumento heptalaminar dos vermes adultos e substituição por novas membranas celulares (formadas na sua face interna) e presença de antigénios do hospedeiro (ou semelhantes a este) adsorvidos ou incorporados à membrana do parasita que previnem o reconhecimento imunológico dos vermes adultos como estranhos ao organismo.

Inceni, Morales & Cesari (2001), citando vários autores, referem que existem estudos feitos em murganhos com *Schistosoma mansoni*, que demonstraram que, este parasita exhibe variações intra-específicas no que diz respeito a sua infectividade, fecundidade e patogenicidade, facto confirmado por estudos isoenzimáticos, imunogenicidade e susceptibilidade imunitária no murganho, proteínas antigénicas e variações na membrana envolvente. Segundo estes autores, também existem evidências de que a imunidade para *S. mansoni* desenvolvida pelos hospedeiros definitivos, vertebrados, assim como a patologia são controlados geneticamente.

Embora alguns estudos demonstrem uma associação não significativa do tempo de exposição ao Praziquantel e a taxa de cura (Black et al., 2009), dois estudos realizados em algumas regiões do Egipto e norte do Senegal têm sido apontados como prova para o possível desenvolvimento de resistência ao PZQ em infecções humanas num outro estudo conduzido entre 1991-1993 foi detectada uma taxa de cura para este fármaco abaixo dos 90% (Botros et al., 2005b.; Gryseels et al., 2001b). Nessa altura, este resultado foi associado ao facto deste fármaco ser ineficaz às formas imaturas e pela contínua exposição dos hospedeiros aos factores de risco (Cioli, 2000).

### 1.7.5 Patologia

A carga parasitária varia de um mesmo indivíduo com o passar do tempo. Este, é um factor determinante para avaliação da gravidade da doença sendo que em áreas endémicas esta vai aumentando com a idade alcançando o seu máximo entre os 15 e 20 ou 25 anos, e a partir dessa faixa etária declina (Rey, 2010).

Davies & McKerrow (2003), referem que é importante interpretar os quadros patológicos e patofisiológico das infecções por parasitas do género *Schistosoma* de acordo com os estadios de desenvolvimento do parasita, como a invasão cercariana e migração do esquistossômulo, maturação, acasalamento e início da oviposição, estabelecimento da infecção com contínua deposição dos ovos e tratamento tardio da infecção e complicações.

Embora as infecções por *S. mansoni* numa fase inicial geralmente sejam assintomáticas, alguns sinais clínicos como, reacções alérgicas na pele podem ser observados em pessoas não imunes, turistas ou imigrantes que provenham infectados de áreas endémicas. Durante o processo de penetração das cercárias através da pele, estes podem provocar exantema, prurido ou outras manifestações alérgicas locais, conhecidas como dermatite cercariana, cuja duração depende da intensidade da resposta inflamatória cutânea local (Ortega et al., 2010; Rey, 2010).

Conforme a infecção vai se estabelecendo, entre 2 a 16 semanas, período no qual ocorre a migração, maturação, acasalamento e a oviposição, começam as manifestações clínicas, ocorrendo um quadro conhecido como *síndrome de Katayama* ou “*snail fever*” em que uma série de sintomas tóxicos e alérgicos incluindo urticária com eosinofilia, febre, dor abdominal e hepatoesplenomegalia ocorrem. O contacto com os antígenos do verme e/ou do ovo, induz a um estímulo antigénico marcado por um rápido aumento dos níveis de anticorpo, elevação dos níveis de imunoglobulinas IgG, IgA e IgM no soro do paciente (Cook & Zumla, 2003).

Quando os vermes adultos, especificamente a fêmea deposita os seus ovos, induzem a uma reacção inflamatória, que com o tempo resulta em granulomas (constitui o elemento anatomopatológico e lesão típica da infecção por este parasita), subsequente fibrose e calcificação demonstrando a importância do ovo como agente patogénico em

relação aos efeitos nocivos produzidos directamente pelos vermes adultos (Rey, 2010; Ortega et al., 2010; Davies & McKerrow, 2003).

### **1.7.6 Diagnóstico**

O diagnóstico é importante, pois permite o conhecimento da etiologia da infecção para que se possa efectuar uma correcta intervenção terapêutica, permite avaliar a frequência de determinadas parasitoses em diferentes áreas, auxilia na orientação das medidas de intervenção local e permite avaliar as medidas profilácticas e terapêuticas ao longo do tempo (De Carli et al., 1997; Vaz, 2001).

A ultra-sonografia é dos diagnósticos clínicos que melhores resultados oferecem, sobretudo em pacientes no estado crónico da schistosomose. Trata-se de uma técnica que diagnostica as alterações hepáticas, determinando com precisão o grau de fibrose (Neves et al., 2004). Localizações ectópicas do parasita também podem ser evidenciadas acidentalmente em exames de imagiologia (Rey, 2010). Segundo Rey (2010), pelo facto dos sinais e sintomas da doença não serem específicos e claros, o diagnóstico clínico por si não é conclusivo, é um diagnóstico de presunção (Belo, 2010a), assim sendo, recorrem-se ao diagnóstico laboratorial.

O diagnóstico laboratorial, pode ser directo também designado diagnóstico parasitológico. O diagnóstico parasitológico, consiste na demonstração da presença do parasita ou ovos nas fezes (Uecker et al., 2006), através de métodos de sedimentação ou centrifugação baseado na alta densidade dos ovos, ou o método de concentração por Kato-Katz (Neves et al., 2004). Estes métodos, fornecem resultados satisfatórios em amostras com cargas parasitárias média ou alta, em casos de baixa carga podem fornecer muitos resultados falsos negativos (Rey, 2010).

Para levantamentos epidemiológicos, recomenda-se a técnica quantitativa de Kato-Katz, apesar da grande variação diária no número de ovos eliminados por paciente quando se trabalha com população. A OMS, recomenda o método de Kato-Katz como rotina por ser o exame de fezes mais sensível, rápido e de fácil execução, é mais preciso quantitativo



e qualitativamente; a eclosão de miracídios, técnicas serológicas, biópsia rectal e hepática devem ser métodos auxiliares (Katz & Almeida, 2003).

O diagnóstico indirecto, é feito através das técnicas imunológicas as quais medem a resposta do organismo do hospedeiro frente ao parasita, permitem evidenciar *in vitro* a reacção antígeno/anticorpo, detectando antígenos, anticorpos e imunocomplexos relacionados com a existência de infecção parasitária (Neves, 2004; Belo, 2010; Rey, 2010). Estas técnicas, caracterizam-se pela simplicidade e rapidez de execução, baixo custo operacional (Rey, 2001 citado por Uecker et al., 2006), porém não permitem a certeza absoluta do parasitismo (Neves, 2004).

Actualmente, o método imunoenzimático denominado ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), constitui um dos melhores instrumentos para o diagnóstico das doenças infecciosas e infecções parasitárias inclusive por *Schistosoma* spp. (Dias et al., 1997; Cimerman & Cimerman, 2002). Por outro lado, a reacção em cadeia da polimerase (PCR), é uma técnica laboratorial que permite uma rápida selecção, isolamento, amplificação e sequenciação de ADN a partir de pequenas quantidades da amostra (McManus & Bowles, 1996). Apesar do custo e complexidade da mesma constituem factores limitantes para o seu uso generalizado, seria ideal principalmente para os casos de controlo de cura e em infecções com baixa carga parasitária (Neves et al., 2004).

#### **1.7.7 Prevenção e controlo**

A schistosomose, continua a constituir um grave problema de Saúde Pública apesar existência de diagnóstico e fármaco para esta parasitose (Figura 8). Segundo Guerrant, Walker & Weller (2011), a prevenção e controlo desta parasitose pode ser feita proporcionando às populações que vivem em áreas de risco melhores condições de saneamento, educação das comunidades para que adoptem medidas de carácter individual e colectivo mais seguras e administração de fármacos como forma de limitar a intensidade da infecção nas áreas endémicas.



**Figura 8:** Exemplo de comportamento de risco, Moçambique, província da Zambézia, Distrito de Namarrói  
(original, Idalécia Moiane)

Segundo a OMS, as estratégias para o controlo desta parasitose devem focar-se na redução do índice da doença, através do tratamento preventivo e devem ser direccionados aos grupos de risco, como crianças em áreas endémicas, adultos com actividades de risco (com permanente contacto com água contaminada), e toda a comunidade que vive em áreas endémicas.

As estratégias para o controlo da schistosomose segundo Fenwick & Webster (2006), actualmente estão centradas na quimioterapia: tratamento dos casos positivos nas áreas de baixa endemicidade, tratamento em massa das crianças em idade escolar nas áreas com moderada endemicidade, ou tratamento em massa de toda comunidade das áreas com alto risco/alta prevalência para esta parasitose, passando também pelo controlo dos hospedeiros intermediários nas áreas endémicas.

### **1.7.8 Tratamento**

A OMS, recomenda até actualmente o uso do Praziquantel (PZQ), pois é o fármaco que tem-se mostrado mais eficaz até ao momento contra todas as formas de schistosomose.

É efectivo, seguro e de baixo custo e ainda que a reinfeção ocorra após o tratamento, o risco de desenvolver a doença de forma severa é reduzido, mesmo que o tratamento tenha iniciado na infância.

O PZQ para além de ser activo para *Schistosoma* sp, também destrói cestóides na luz intestinal. É facilmente adsorvido por via oral, alcança a concentração máxima no soro ao fim de 1 a 2 horas. O tratamento com este fármaco é feito com administração oral de 40 mg/kg de peso do paciente, dose única; em infecções pesadas, recomenda-se a administração de duas doses de 25 mg/kg ou 30 mg/kg separadas por intervalos de quatro horas (Rey, 2010; Guerrant et al., 2011).

Segundo a OMS, o PZQ é seguro inclusive para as mulheres grávidas ou a amamentar, e estas deverão ser tratadas imediatamente assim que seja diagnosticada a infecção. As mulheres em idade fértil, deverão igualmente ser tratadas, sobretudo ao longo das rondas de quimioterapia em massa, devido a alta probabilidade que têm de desenvolver a anemia e ficarem grávidas (Guerrant et al., 2011).

### **1.8 Ferramentas moleculares aplicadas ao estudo de *Schistosoma* sp**

Vários estudos epidemiológicos têm sido realizados, onde frequentemente recorrem-se às técnicas microscópicas para a sua detecção no campo (Machado-Silva et al., 2005; Hove et al., 2008). As técnicas microscópicas, apesar de oferecerem alguma complexidade como tempo de processamento, dificuldades de identificação, forma de processamento das amostras, são relativamente mais baratas, fáceis de executar e oferecem informações relativas a prevalência e intensidade de infecção por *Schistosoma* sp (Fedmeier & Poggensee, 1993).

Como alternativa para este processo moroso e inconveniente em estudos epidemiológicos, técnicas baseadas na reacção anticorpo-antígeno provaram ser adequadas para estudos em campo, porém estas são incapazes de distinguir infecções recentes de infecções antigas. Algumas técnicas imunológicas, mostraram-se pouco aplicáveis em estudos em campo, como é o caso da técnica baseada na detecção de antígeno na urina (como alternativa para a detecção de infecção por *S. mansoni*), que

mostrou-se menos sensível em relação a infecções com *S. haematobium*, sendo que a solução para esta questão provavelmente seria a escolha de sangue como produto biológico para a sua detecção, porém, recolha de sangue para este tipo de estudo não é de modo algum exequível muito menos recomendado para estudos de campo em áreas endêmicas (Araújo et al. 1997; van Dam et al., 2004; Gryseels et al., 2006).

Vários estudos foram realizados com objectivo de analisar a variabilidade genética de *S. mansoni* usando caracteres morfológicos dos ovos, perfil de eliminação de cercárias e vermes adultos. As isoenzimas, foram os primeiros marcadores genotípicos usados para caracterizar a variabilidade das estirpes de *S. mansoni*. Antes do desenvolvimento da técnica de PCR no final dos anos 1980, alguns marcadores moleculares já eram usados para estudar a variabilidade genética deste parasita: ADN mitocondrial, sondas de ARN, Amplificação arbitrária de ADN polimórfico (RAPD) e microssatélites (Braschi, Borges & Wilson, 2002; Verjovski-Almeida et al., 2003; Gentile & Oliveira, 2008).




A técnica RAPD, baseia-se na repetição cíclica da extensão enzimática de iniciadores (pequenas sequências complementares de ADN) que se anelam nos dois extremos opostos de uma fita de ADN que serve como molde. Nesta técnica, utiliza-se apenas um único *primer* ao invés de um par, como na PCR, e esse *primer* tem sua sequência arbitrária, e portanto sua sequência alvo é desconhecida (Millach et al, 1997; De Araújo et al., 2003; Mohamed et al., 2011). Para o caso de estudos em *Schistosoma* sp, é possível distinguir espécies, estirpes e verme macho ou fêmea (Barral et al., 1993; Tsai et al., 2000).

Esta técnica, geralmente envolve o uso de iniciadores (*primers*) com dez bases, em um protocolo de PCR de baixa selectividade; os iniciadores anelam-se a numerosos locais homólogos do genoma para gerar um grande número de fragmentos de ADN por meio de subsequentes amplificações. Esses iniciadores, geram padrões distintos de fragmentos, o que permite uma investigação sobre a variação genética dos exemplares em questão (Rollinson et al., 1997). Com essa metodologia, há a possibilidade do uso de um número praticamente ilimitado de iniciadores, cada um com diferentes regiões do genoma como alvos (Dahle, Rahman & Eriksen, 1997).

## 1.9 Objectivos

Embora a microscopia não possa ser totalmente substituída, as técnicas moleculares têm demonstrado ser de grande aplicabilidade sobretudo para estudos epidemiológicos ao detectar a partir de pequena quantidade de amostras a existência ou não de infecção. Com base na técnica de PCR, têm sido desenvolvidas várias técnicas moleculares caracterizadas por requererem baixa quantidade de amostra de ADN e/ou de produto biológico o que é vantajoso pois não requer a cultura (McManus & Bowles, 1996).

Neste âmbito, dada a importância mundial da schistosomose e o impacto social que causa, foi desenvolvido o presente estudo com o objectivo geral de analisar as diferenças genéticas existentes entre diferentes estirpes de *Schistosoma mansoni* com diferente susceptibilidade ao hospedeiro definitivo. Adicionalmente, foram traçados os seguintes objectivos específicos:

-  Extrair o ADN genómico de vermes de *Schistosoma mansoni* (estirpe BH);
-  Amplificar o ADN genómico através da técnica molecular RAPD-PCR;
-  Identificar e avaliar potenciais polimorfismos associados a presença de diferentes hospedeiros definitivos aplicando marcadores de RAPD-PCR.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 2.1 Obtenção do material biológico

### 2.1.1 Modelo animal

Os vermes obtidos para o presente estudo, foram extraídos de 5 murganhos acondicionados no Biotério do IHMT. De cada murganho, foram seleccionados 8 vermes adultos os quais foram agrupados em grupos de macho, fêmea e *pool*. Assim sendo, foram obtidos 40 vermes de *S. mansoni*, destes 20 eram fêmeas e 20 machos, sob diferentes condições imunológicas do hospedeiro definitivo, o murganho. Para o efeito, foram analisados os perfis genéticos obtidos de vermes de *S. mansoni*, estirpe BH que infectaram murganhos *Mus musculus* das seguintes estirpes: CD1, C57BL/6J,  $Ja18^{-/-}$  e TGF $\beta$ RIIdn.

Os vermes da estirpe Belo Horizonte (BH) obtidos de murganhos *M. musculus* CD1 normais são usados para a manutenção do ciclo do parasita no laboratório da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia/Helminologia e Malacologia Médicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (UEIP-IHMT). Esta estirpe, é mantida com passagens entre os murganhos *M. musculus* da estirpe CD1 e moluscos *Biomphalaria glabrata*. Paralelamente, foram administrados 100mg de PZQ, dose única, por via oral, aos murganhos *M. musculus* CD1 infectados pela estirpe BH do parasita em estudo, tendo-se designado a este segundo grupo de Ensaio de Resistência, e considerado como grupo resistente ao PZQ.

As estirpes subsequentes, apresentavam condições imunológicas específicas, foram fornecidas pela *The Jackson Laboratory* e posteriormente infectados com cercárias de *S. mansoni* da estirpe BH. Trata-se das seguintes estirpes (vermes designados de acordo com a designação dada ao hospedeiro definitivo):



**C57BL/6J:** cujos vermes foram obtidos de murganhos C57BL/6J. Esta estirpe de murganho é amplamente usado como “*background genético*” para o desenvolvimento de murganhos geneticamente modificados. No presente estudo, também foram usados para a obtenção das estirpes  $Ja18^{-/-}$  e TGF $\beta$ RIIdn;

🔗 **Ja18<sup>-/-</sup>** (C57BL/6-Tg(Cd4-TcraDN32D3)1Aben/J): os vermes foram extraídos de murganhos deficientes em células iNKT, ou seja não apresentam o receptor TCR que resulta do rearranjo entre os segmentos Va14 e o segmento Ja18;

🔗 **TGFβRIIdn** (B6.Cg-Tg(Cd4-TGFBR2)16Flv/J): vermes obtidos de murganhos transgênicos que expressam uma forma dominante-negativa do factor de transformação de crescimento, receptor beta II (dnTGFBRII) sob a direcção do promotor antigénico CD4 do murganho. A expressão do transgene é suficiente para bloquear a sinalização da TGF-β especificamente pelas células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do hospedeiro.

Todos os vermes foram extraídos por perfusão através da circulação portal e do fígado, separados e analisados por morfometria em grupos de macho, fêmea e *pool* (Figura 9). Os murganhos em estudo apresentavam cerca de 20 g, foram mantidos no biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical à 21±1°C de temperatura, 45-55% de humidade e ciclos de 12h de luz/escuridão e mantidos no Biotério em conformidade com a Legislação Nacional e Europeia sobre o bem estar animal.



**Figura 9:** Obtenção do material biológico a) Perfusão. b) Vermes de *S. mansoni* macho. c) Vermes de *S. mansoni* fêmea (original, Idalécia Moiane)



### **2.1.2 Confirmação e quantificação da infecção**

Os murganhos foram infectados de forma natural, expondo a causa a cerca de 100 cercárias de *S. mansoni* (nos murganhos normais) e 45 cercárias (nos murganhos transgênicos), a avaliação da carga parasitária foi efectuada 7 semanas após a infecção e foram sacrificados 8 semanas após a infecção. Considerou-se infecção estável presença de 120-240 ovos/g de fezes, o que é um indicativo de que os vermes atingiram o estado adulto. A infecção foi confirmada pelo método qualitativo de Teleman-Lima e o quantitativo Kato-Katz (Anexos 1 e 2).

## **2.2 Análise molecular**

### **2.2.1 Extracção ADN genómico**

Para a extracção do ADN dos vermes adultos, foi necessário agrupar os vermes em grupos de macho, fêmea e pool. Para os grupos de machos usou-se 2 vermes e para o grupo *pool* usou-se 4 vermes (sendo 2 machos e 2 fêmeas).

A extracção foi feita usando o protocolo CTAB (tampão brometo de hexadeciltrimetilamônio), descrito por Stothard et al. (1998), com ligeiras modificações. Os vermes devidamente separados e identificados foram colocados em tubos de eppendorf de 1,5ml com 600µl de tampão CTAB (2M tris acetato 0,05 EDTA, pH=8,3) previamente aquecido na estufa a 56,5°C durante 10 minutos. Adicionaram-se 10µl de proteinase K para desproteinização e triturou-se os vermes usando um macerador. De seguida foram levados para estufa à 56,5°C, durante 1 hora e 30 minutos agitando de 15 em 15 minutos. A primeira extracção dos ácidos nucleicos foi feita adicionando 600µl de clorofórmio de Isoamyl 24:1, agitou-se por inversão durante 2 min, separando-se a fase orgânica da fase aquosa por centrifugação rápida. De seguida retirou-se a fase superior, o sobrenadante, para novos tubos de eppendorf com 800µl de etanol gelado para precipitar o ADN, centrifugou-se a 13000rpm durante 20 minutos.

Desprezou-se o sobrenadante e fez-se a lavagem do *pellet* com 500µl de etanol a 70%, centrifugou-se a mais uma vez a 13000rpm durante 20 minutos, retirou-se o

sobrenadante total e levou-se à estufa a 55 por 15 minutos. O ADN foi ressuspensionado em 50µl de solução TE (10mM Tris, 1 mM EDTA pH=8).

### **2.2.2 Condições de amplificação do ADN genómico**

O ADN genómico total e o diluído foram amplificados através da técnica de PCR e processado em tubos IllustraTm puReTaq Ready-to-go PCR Beads (GE Healthcare, UK), tendo sido apenas necessário adicionar ADN e água bidestilada. Foi amplificada a região ITS, usando *primers* da Eurofins MWG Operon com a seguinte sequência 5'-TGC TTA AGT TCA GCG GGT- 3' e 5'-TAA CAA GGT TTC CGT AGG TGA- 3'.

Aos tubos de PCR foram adicionados os seguintes reagentes: 21,5µl de água, 1µl de cada *primer* 2,5µl de ADN genómico e o volume final de 21,9µl de água. As reacções de amplificação foram conduzidas em termociclador GnBh Mechatronic Systems, e submetidas a 32 ciclos após a desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos. Cada ciclo constitui-se de 45 segundos a 95°C, 1 minuto a 54°C e 1 minuto a 72°C. Ao final dos 32 ciclos, foi realizada a extensão final a 72°C durante 5 minutos e posteriormente 26°C durante 1 segundo. No gel de agarose, usou-se 2,5µl dos produtos de PCR amplificados, 2 µl de tampão Azul de Bromofenol com glicerol e 5µl do marcador de 2000 pb (HyperLadder II, Bioline). Estas alíquotas, foram corridas em tampão de TAE 1X (2M Tris-Acetato, 0,05 Mm EDTA, pH=8,3) por electroforese em gel de agarose a 1%, corado com 5 µl de Brometo de Etídio, a 120V. Os géis foram visualizados no transiluminador (Alphamager® HP, Alpha Innotech) de luz ultravioleta e fotografados.

### **2.2.3 Marcadores RAPD-PCR**

Aplicou-se a técnica RAPD apenas nos produtos de extracção total, pois o diluído apresentou uma baixa qualidade de amplificação. Testaram-se 10 iniciadores decâmeros da Eurofins MWG Operon, com 10 sequências de nucleótidos. Estes iniciadores desenhados especificamente para a técnica RAPD, fornecem produtos de PCR diferentes, permitindo a identificação de polimorfismos de ADN que podem ser usados para identificar indivíduos

diferentes ou como marcadores genéticos para amplificação e detecção de polimorfismos (Tabela 1):

**Tabela 1:** Marcadores RAPD-PCR utilizados e suas respectivas sequências de nucleótidos (Tsai et al., 2000)

Designação	Sequência (5'→ 3')
OPI-03	CAG AAG CCC A
OPI-05	TGT TCC ACG G
OPI-06	AAG GCG GCA G
OPI-07	CAG CGA CAA G
OPI-08	TTT GCC CGG T
OPI-09	TGG AGA GCA G
OPI-12	AGA GGG CAC A
OPI-16	TCT CCG CCC T
OPI-17	GGT GGT GAT G
OPI-18	TGC CCA GCC T

A reacção de amplificação foi realizada em tubos de PCR descritos na amplificação do ADN genómico, tendo sido adicionado 0,1µl MgCl<sub>2</sub>, 21,4µl de água bidestilada, 1µl do respectivo *primer* e 2,5µl do ADN. A amplificação teve lugar no termociclador GnBh Mechatronic Systems programado para 35 ciclos, a desnaturação inicial foi de 92°C durante 5 minutos; posteriormente 1 minuto a 92°C, 4 minutos a 34°C e 2 minutos a 72°C e extensão final a 10 minutos a 72°C. A electroforese foi efectuada em gel de agarose a 1,5%

corado com 10µl Brometo de Etídio, foram aplicados 8µl do produto amplificado corado com 5µl de tampão Azul de Bromofenol, os fragmentos foram visualizados a luz ultravioleta e fotografados.

### 2.3 Análise dos perfis electroforéticos

A análise da similaridade genética foi realizada com base na construção de uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados e codificados em sistema binário, atribuindo-se (1) para a presença e (0) para a ausência de bandas. Foram consideradas as bandas visíveis, enquanto as de difícil resolução não foram incluídas. A similaridade entre as amostras foi estimada pelo “Coeficiente de Similaridade de Jaccard” (Sneath & Sokal, 1973), para o cálculo das similaridades genéticas para as diferentes amostras, de acordo com a expressão:

$$S_{ij} = a/a+b+c$$

a – número de bandas presente em todos os indivíduos

b – número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo *i*

c – número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo *j*

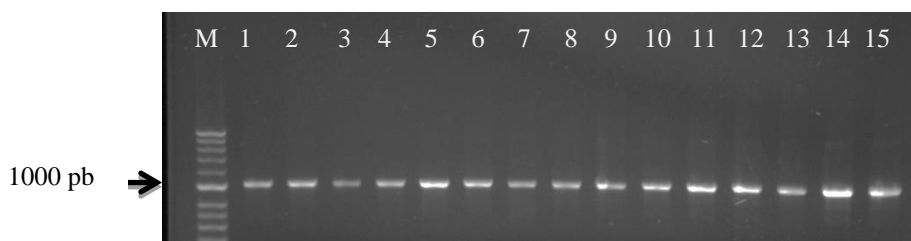
### **3. RESULTADOS**

---

### 3.1 Análise molecular

#### 3.1.1 Amplificação do ADN genómico

Na análise molecular das amostras em estudo, foi amplificada a região ITS (Região Interna Transcrita) do ADN ribossomal, e na qual foi amplificado um fragmento com aproximadamente 1000 pb, não havendo variação no produto de PCR (Figura 10).



**Figura 10:** Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS de estirpes de *S. mansoni* (M, marcador molecular, 2000pb)

Em todas as amostras amplificadas não foram observados fragmentos inespecíficos, ou seja, todas apresentaram um padrão específico e esperado de amplificação.

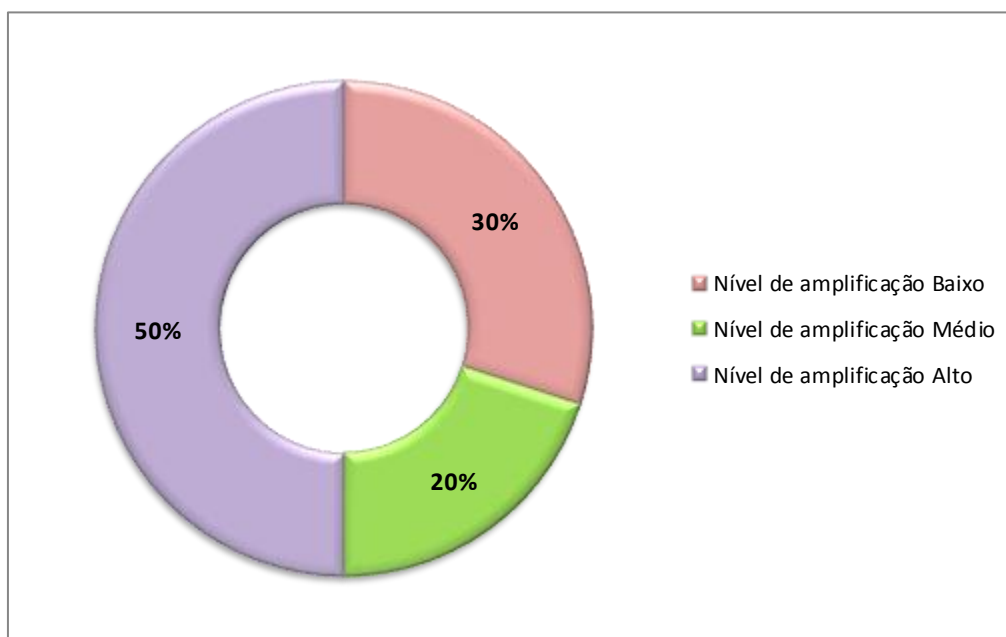
#### 3.1.2 Análise genética por RAPD

##### 3.1.2.1 Marcadores RAPD-PCR

Para o presente estudo, foram analisados os padrões electroforéticos obtidos de 10 marcadores RAPD. Os padrões obtidos com a aplicação destes *primers* não foram lineares, tendo-se registado algumas diferenças, quer a nível de amplificação, quer a nível do perfil obtido. Do total dos 10 marcadores usados apenas um, o OPI-5, não funcionou.

### 3.1.2.2 Nível de amplificação

O nível de amplificação dos *primers* foi variado, 50% (5/10) produziram alto nível de amplificação, ou seja, foi possível distinguir os pesos moleculares de fragmentos que amplificaram (Figura 11). Os *primers* com baixo nível de amplificação corresponderam a 20% (2/10), pois não apresentaram uma boa resolução de amplificação, não sendo possível determinar com clareza os respectivos pesos moleculares, e por esse motivo não aplicados para a identificação de polimorfismo.



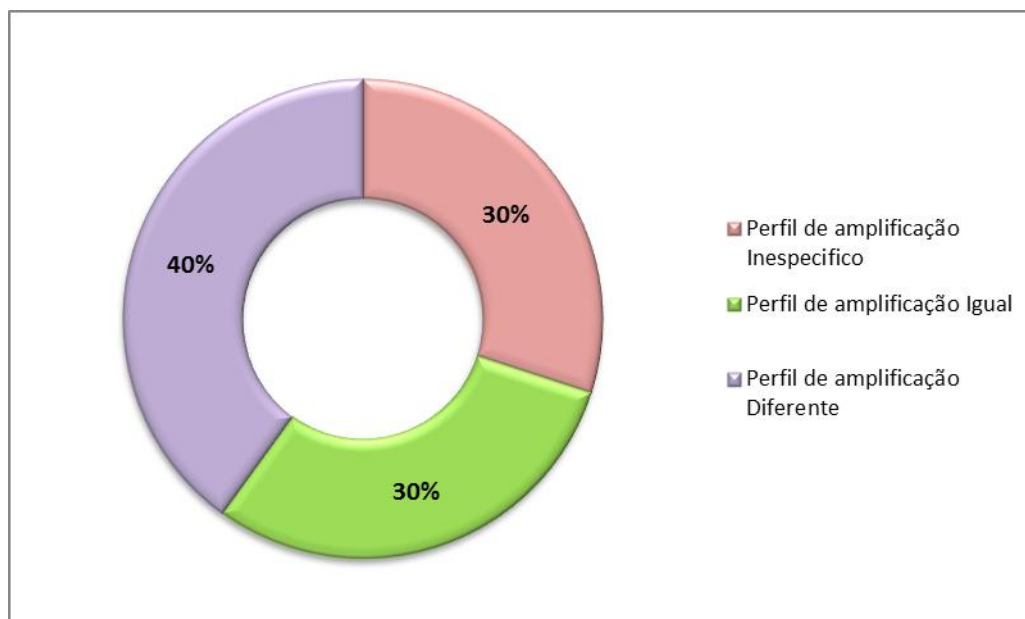
**Figura 10:** Nível de amplificação

O OPI-8 e OPI-17 apresentaram baixo nível de amplificação, OPI-9 e 12 médio e por o alto nível de amplificação foi observado nos OPI-3, OPI-6, OPI-7, OPI-16 e OPI-18.

### 3.1.2.3 Perfil de amplificação

O perfil de amplificação também se mostrou ser variado, considerando que 40% (4/10) dos *primers* apresentaram fragmentos com diferentes pesos moleculares e 30% (3/10), fragmentos com perfil de amplificação igual (indivíduos que apresentaram os

mesmos pesos moleculares). Foram considerados com perfil de amplificação inespecífico, os *primers* cuja análise dos pesos moleculares não foi possível determinar (Figura 12).



**Figura 112:** Perfil de amplificação

O OPI-8 e OPI-17 apresentaram um perfil de amplificação inespecífico, OPI-6, OPI-9 e OPI-16 igual perfil (indivíduos apresentaram iguais pesos moleculares entre si consoante o marcador) e os OPI-3, OPI-7, OPI-12 e OPI-18 perfil diferente.

### 3.2. Análise genética de estirpes de *S. mansoni*

Para a análise genética das estirpes de *S. mansoni* em estudo, fez-se uma comparação dos fragmentos amplificados e fornecidos pelos *primers* com médio e alto nível de amplificação e que apresentassem um perfil diferente. Assim sendo, foram analisados polimorfismos obtidos dos OPI-3, OPI-7, OPI-12 e OPI-18 em estirpes agrupadas em fêmea, macho e *pool*.

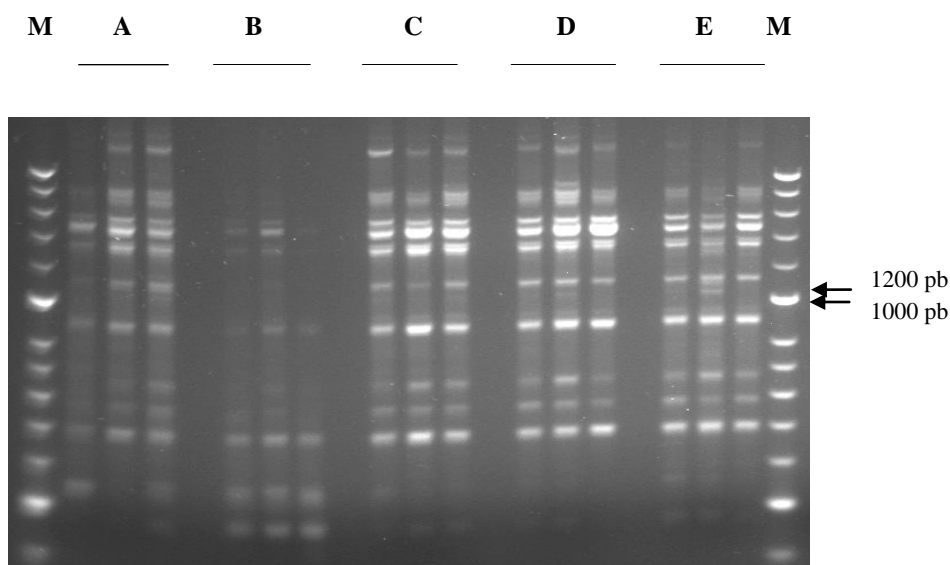


### 3.2.1 Análise dos fragmentos obtidos

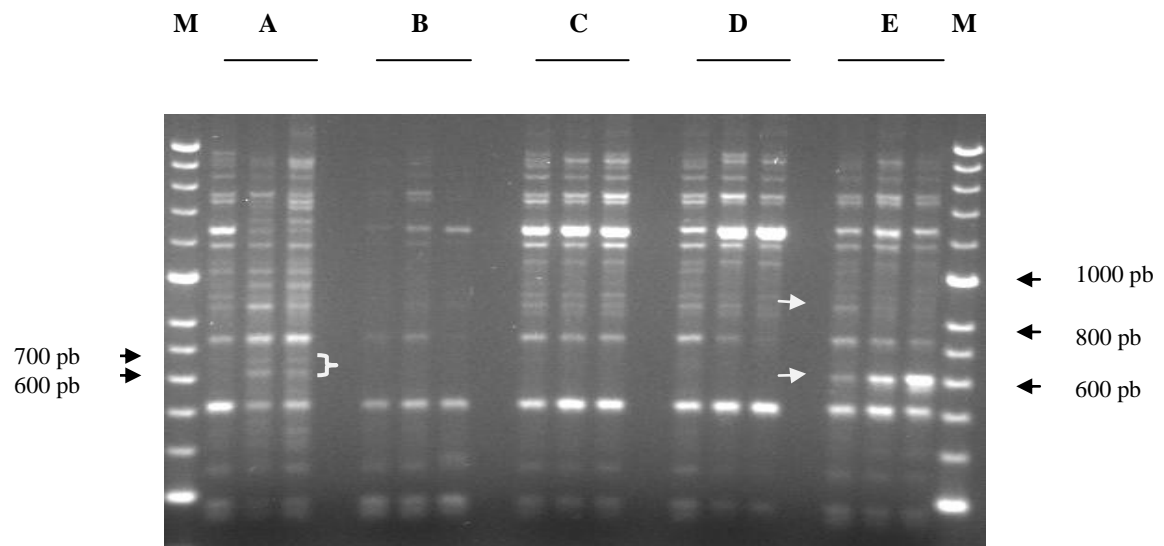
As amplificações obtidas através destes 4 *primers*, resultaram em 437 fragmentos e produziram um padrão RAPD de amplificação com fragmentos cujos pesos moleculares estiveram entre os 200 pb e os 2000 pb conforme o *primer* e a estirpe em causa (Figura 13-16 e Tabela 2).

A frequência de cada fragmento foi variada, não sendo observados fragmentos comuns a todas as estirpes. A estirpe ER apresentou um perfil de amplificação pouco comum e o menor número de fragmentos aplicando todos *primers* exceptuando para o OPI-18 (Figura 13-16).

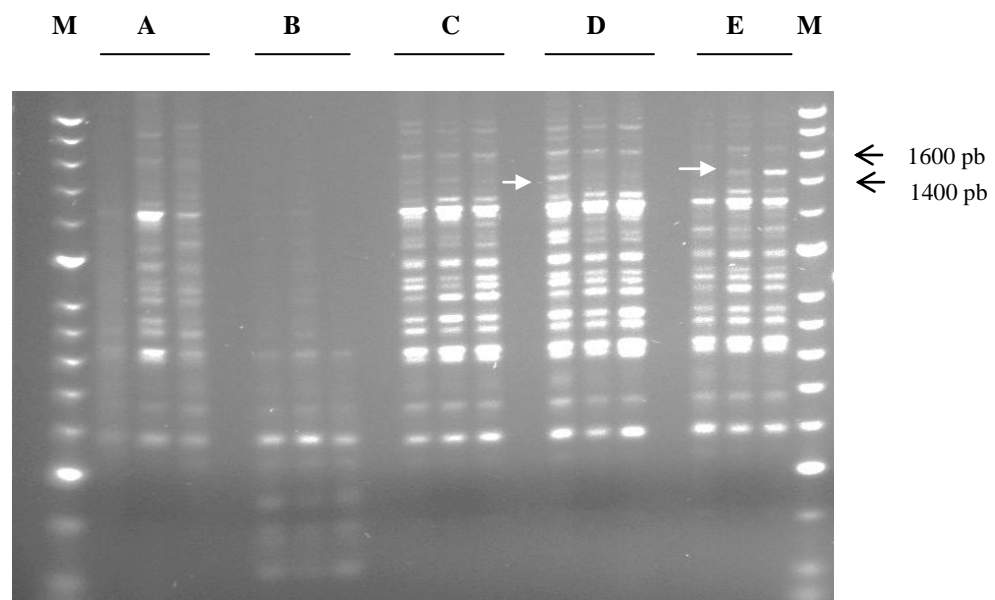
As amostras obtidas de animais transgênicos no geral um perfil de amplificação muito semelhante às amostras obtidas de murganhos da estirpe CD1 (Figura 13-15, A e C, D, E), com excepção da amplificação obtidas com o OPI-18 (Figura 16). Embora os quatro marcadores em análise tenham exibido pelo menos um fragmento polimórfico, usando o OPI-7 foi clara a ausência de dois fragmentos nos perfis dos vermes obtidos de murganhos da estirpe CD1, fêmea, de aproximadamente 600 e 690 pb (Figura 14).



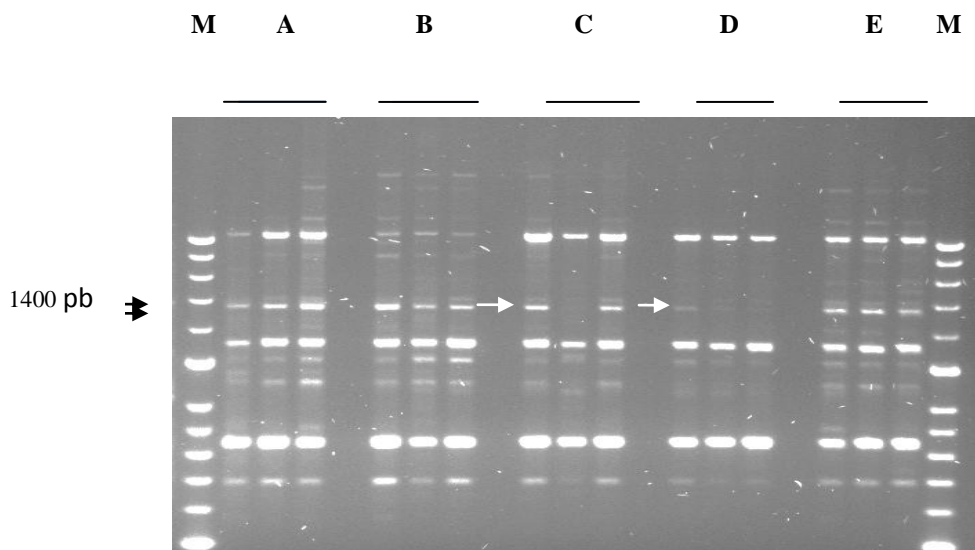
**Figura 13:** Gel de agarose 1.5% usando o OPI-3. **M**, marcador molecular 2000 pb. **A**, estirpe CD1. **B**, estirpe ER. **C**, estirpe C57BL/6J. **D**, estirpe Ja18<sup>-/-</sup>. **E**, estirpe TGFβRIIdn



**Figura 14:** Gel de agarose 1,5% usando o OPI-7. **M**, marcador molecular 2000 pb. **A**, estirpe CD1. **B**, estirpe ER. **C**, estirpe C57BL/6J. **D**, estirpe  $Ja18^{-/-}$ . **E**, estirpe TGF $\beta$ RIIdn



**Figura 12:** Gel de agarose 1.5% usando o OPI-12. **M**, marcador molecular 2000 pb. **A**, estirpe CD1. **B**, estirpe ER. **C**, estirpe C57BL/6J. **D**, estirpe  $Ja18^{-/-}$ . **E**, estirpe TGF $\beta$ RIIdn



**Figura 13:** Gel de agarose 1.5% usando o OPI-18. **M**, marcador molecular 2000 pb. **A**, estirpe CD1. **B**, estirpe ER. **C**, estirpe C57BL/6J. **D**, estirpe  $J\alpha 18^{-/-}$ . **E**, estirpe TGF $\beta$ RIIdn

Também foi clara a ausência de fragmentos usando o OPI-18, em que pode-se distinguir os vermes obtidos de murganhos das estirpes C57BL/6J e  $J\alpha 18^{-/-}$  pela presença ou ausência de fragmento de aproximadamente 1400pb (Figura 16, C e D). Os vermes de murganhos da estirpe CD1 apresentaram o maior número de fragmentos (n=95) e o menor foi observado dos vermes obtidos de murganhos ER (n=76). Dentro dos vermes de *S. mansoni* obtidos de animais transgênicos o maior número de fragmentos foi observado nos vermes obtidos de murganhos da estirpe TGF $\beta$ RIIdn (n=90). Por sua vez, o OPI-12 apresentou o maior número de fragmentos amplificados (n=141) contrariamente ao OPI-18 que apresentou o menor número (n=68).

**Tabela 2:** Lista dos *primers* e número de fragmentos para cada estirpe de *S. mansoni*

	ESTIRPES ESTUDADAS									
	CD1		ER		C57BL/6J		$J\alpha 18^{-/-}$		TGF $\beta$ RIIdn	
PRIMER	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
OPI-3	13	13	12	12	12	11	12	12	12	13
OPI-7	11	14	9	9	10	10	10	10	12	11
OPI-12	13	17	10	10	16	16	16	15	13	15
OPI-18	7	7	7	7	7	6	7	6	7	7
Total	44	51	38	38	45	43	45	43	44	46

### 3.2.2 Identificação de polimorfismos

Foram obtidos 15 fragmentos específicos conforme a estirpe, sexo e marcadores utilizados. O OPI-7 foi o que mais fragmentos específicos amplificou (8 fragmentos) e o OPI-3 foi o que menos fragmentos específicos amplificou.

Analisando as estirpes em estudo, constatou-se que os vermes de *S. mansoni* obtidos de murganhos da estirpe TGFβRIIdn apresentaram o maior número de fragmentos polimórficos (7 fragmentos) em relação às demais. Os vermes obtidos de murganhos da estirpe CD1 apresentaram um total de 4 fragmentos polimórficos, e os obtidos das estirpes C57BL/6J e Jα18<sup>-/-</sup> apresentaram apenas 2 fragmentos polimórficos. Os vermes obtidos do murganho ER aparentemente não registaram nenhum fragmento polimórfico (Figura 13-15).

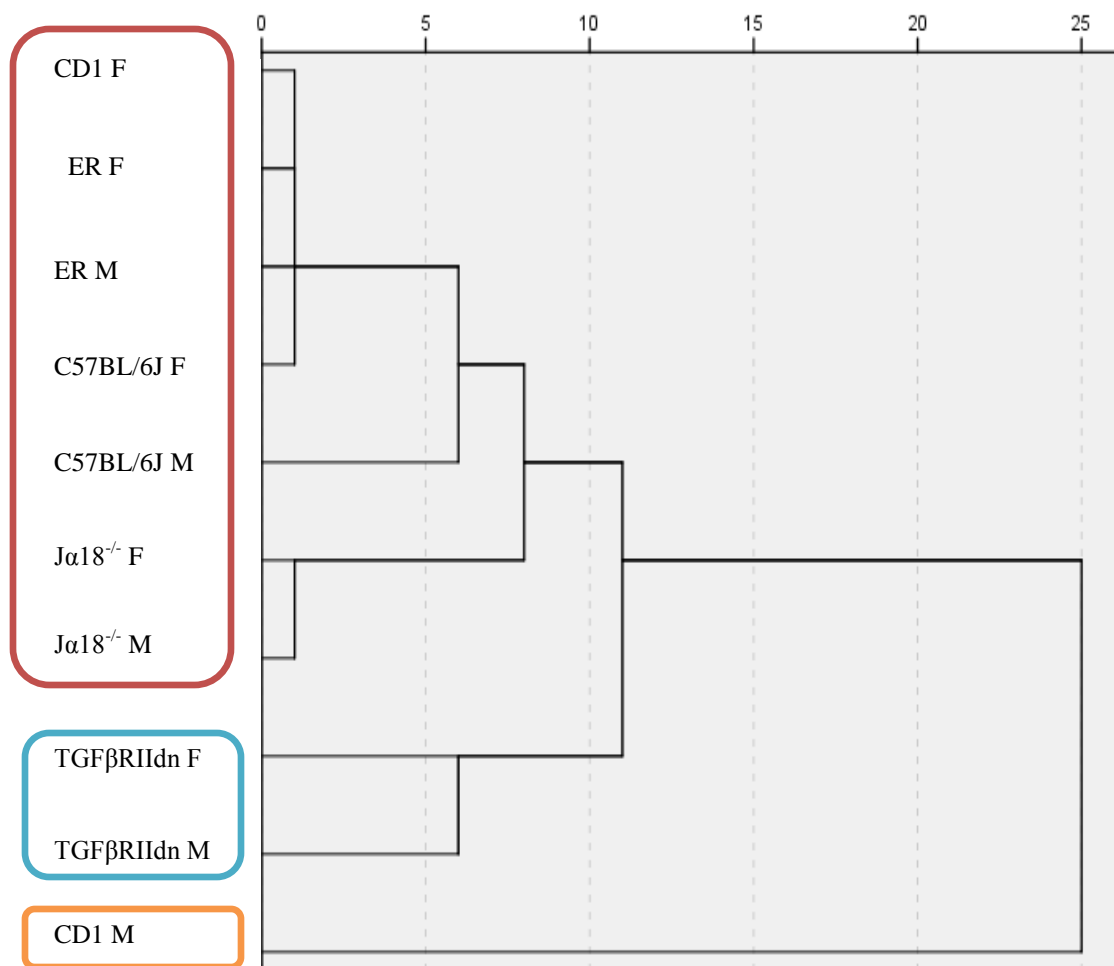
Em relação aos fragmentos específicos, para cada população de vermes de *S. mansoni* em função do *primer* em uso, observou-se que os vermes *S. mansoni* que infectaram o murganho da estirpe C57BL/6J o perfil RAPD-PCR demonstrou a existência de três fragmentos diferentes em relação ao perfil dos vermes que infectaram o murganho da estirpe CD1. Por outro lado, comparando com o perfil RAPD-PCR dos vermes que infectaram a estirpe CD1, observou-se apenas um fragmento diferente nos vermes que infectaram o murganho da estirpe Jα18<sup>-/-</sup> e seis para os que infectaram murganhos TGFβRIIdn (Figura 13-15).

### 3.2.3 Similaridade (ou distância) genética entre as estirpes de *S. mansoni*

As diferenças dos perfis de RAPD-PCR, entre os vermes de *S. mansoni* obtidos nas diferentes estirpes de murganhos, usando apenas o OPI-7 parecem ter produzido uma maior variabilidade genética, permitindo efectuar uma análise de proximidade e/ou distância das populações em estudo.

A análise de dendrograma demonstrou a existência de 3 agrupamentos. O primeiro agrupamento é constituído pelos vermes de *S. mansoni* que infectaram murganhos da estirpe CD1 (verme fêmea apenas), ambos sexo para ER, C57BL/6J e Jα18<sup>-/-</sup>; o segundo

agrupamento pelos vermes macho que infectaram murganhos da estirpe CD1 e por último pelos vermes fêmea e macho que infectaram murganhos da estirpe TGFβRIIdn (Figura 17).



**Figura 17:** Dendrograma de agrupamentos de estirpes de *S. mansoni* usando o OPI-7

## **4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

---

#### 4. Discussão e Conclusão

A análise genética usando marcadores RAPD em estudos de *S. mansoni* foram desenvolvidas com o objectivo de discriminar espécies, estirpes e indivíduos desta espécie (Barral et al., 1993; Dias et al., 1993; Bardacki et al., 2000). Esta técnica parece ter demonstrado ser aplicável na identificação de diferenças genéticas nos genomas de populações de *S. mansoni* sensíveis e resistentes aos fármacos e provenientes de áreas geográficas diferentes (Tsai et al., 2000). Assim, os marcadores RAPD parecem revelar ser de grande utilidade no estudo de diversidade genética não apenas nas áreas acima mencionadas mas também para determinação genética, ainda que discreta, de diferentes estirpes de vermes adultos mantidos em laboratório (Sire et al., 1999) conforme pôde-se observar no presente estudo no que se refere aos polimorfismos observados nos vermes de *S. mansoni* (estirpe BH), obtidos nos murganhos da estirpe CD1, usados para a manutenção laboratorial do ciclo do parasita.

Os 10 primers testados no presente estudo foram seleccionados por terem sido testados no estudo preliminar realizado por Tsai et al. (2000), tendo sido identificados fragmentos polimórficos entre estirpes de *S. mansoni* resistente e sensíveis ao PZQ. Contudo e comparando os resultados obtidos, constatou-se que tal como o autor acima citado observou no seu estudo, os OPI-6, OPI-7, OPI-16 e OPI-18 apresentaram alto nível de amplificação. O mesmo foi observado em relação ao perfil, observando-se a existência de fragmentos com o mesmo peso molecular em todas as estirpes quando se usou o OPI-6, e, diferente quando se trata de OPI-7, OPI-12 e OPI-18, sugerindo que estes últimos possam ser facilmente aplicáveis em estudos sobre variabilidade genética de *S. mansoni* em murganhos sob pressão farmacêutica e/ou transgénicos.

A diferença no perfil de amplificação, especificamente para aqueles marcadores que registaram os mesmos pesos moleculares em todas as estirpes, permite-nos concluir que apesar de ter existido alguma variabilidade no *background* genético das estirpes em estudo, estas estirpes apresentam regiões em comum, conservadas e observável tanto nos vermes extraídos em organismos transgénicos, sob pressão terapêutica e/ou susceptíveis a infecção.

Por outro lado, o OPI-7 apresentou tal como o estudo realizado por Tsai et al. (2000), a maior variabilidade e maior número de fragmentos polimórficos, o que sugere que este *primer* seja um óptimo marcador, que pode ser de grande utilidade como referência em estudos de campo e laboratoriais em que se pretenda caracterizar estirpes de *S. mansoni* provenientes de diferentes áreas geográficas ou de hospedeiros definitivos cujo sistema imunológico foi manipulado.

Sabe-se que, os parasitas do género *Schistosoma* são capazes de promover mudanças genéticas quando no interior do molusco ou hospedeiro vertebrado durante o seu processo de invasão, ao aproveitar-se da resposta imunológica desencadeada pelo hospedeiro em causa, em prol do seu desenvolvimento e manutenção do seu ciclo evolutivo (Karanja et al., 1997; He et al., 2001; Cardoso et al., 2008). Para que a infecção se estabeleça e progrida do hospedeiro definitivo para o molusco, os ovos devem ser translocados pela circulação portal para o lúmen intestinal, e este processo, depende completamente do sistema imunológico do hospedeiro razão pelo qual não ocorra em indivíduos imunossuprimidos (Doenhoff, 1977; Amiri et al., 1992) e murganhos tolerantes aos ovos de *S. mansoni*.

A TGF- $\beta$  é uma proteína que controla a proliferação, diferenciação, crescimento celular que também actua como um factor antiproliferativo em células epiteliais normais e em estágios iniciais da oncogénese. Esta proteína, pode actuar activamente como uma citocina no mecanismo imunossupressor da infecção, como uma citocina imunorreguladora durante infecções helmínticas crónicas. Por outro lado, as células NKT apresentam propriedades tanto das células T como das células NK, e deste grupo heterogêneo fazem parte as células iNKT que expressam exclusivamente uma cadeia  $\alpha$  invariante dos receptores da célula T (TCR) que em murganhos o rearranjo resulta em V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 (V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18, nos humanos). Estas células são importantes no balanço da resposta imune Th1 e Th2 na schistosomose (Arosa, Cardoso & Pacheco, 2007; Mallavaey et al., 2007; Huyse et al. 2009).

Neste contexto, ao analisar os perfis genéticos obtidos de *S. mansoni* em murganhos da estirpe CD1 e C57BL/6J (Figura 13-16, C), observa-se que estes apresentam basicamente o mesmo perfil exceptuando quando se usou o OPI-12 e OPI-18. Visto que as



diferenças observadas não foram ao nível de todo o grupo (macho, fêmea) mas a nível individual, leva-nos a concluir que, apesar de se tratar de estirpes de murganhos diferentes, os vermes que os infectaram apresentaram algumas alterações no seu perfil genético, observáveis através dos polimorfismos individuais nos vermes macho e fêmea.

Dentro dos vermes obtidos dos murganhos tratados com 100mg de PZQ, não se observaram variações, pressupondo-se que apesar de estarem em ambiente sob pressão farmacêutica de PZQ o macho, fêmea e *pool* não sofreram nenhuma pressão selectiva. Este facto, provavelmente esteja relacionado com o modo de acção do PZQ, que actua aumentando a permeabilidade da membrana do cálcio, causando contracções e paralisia da musculatura dos parasitas. Deste modo, os vermes são desprendidos e desintegrados das paredes do intestino do hospedeiro definitivo neste caso, e como tal não afectando o sistema interno do parasita, pelo que provavelmente fez com não fossem observadas modificações nos perfis genéticos dos vermes obtidos de murganhos tratados.

Apesar dos perfis dos vermes de *S. mansoni* macho extraídos de murganhos da estirpe  $J\alpha 18^{-/-}$  e  $TGF\beta RIIdn$ , apresentarem fragmentos polimórficos, as fêmeas apresentaram o maior número de fragmentos polimórficos (e no caso dos vermes de  $J\alpha 18^{-/-}$  apenas a fêmea apresentou polimorfismo). Este aspecto, provavelmente esteja relacionado com o facto de que, sendo os murganhos da estirpe  $J\alpha 18^{-/-}$  deficientes de células iNKT, que apenas são importantes na fase aguda da infecção em particular antes da libertação dos ovos, para a secreção de citocinas imunoreguladoras (Beall et al. 2001; Mallavaey et al., 2007), afectarem profundamente o processo reprodutivo por parte da fêmea. A presença de fragmentos apenas neste grupo de vermes, implica a ocorrência de algum processo selectivo que afectou particularmente a fêmea (Figura 16 e 17). Há que ressaltar que, apesar destes murganhos serem deficientes em células iNKT, não estão insetos de outro tipo de células, as não-iNKT por exemplo, que podem secretar outro tipo de citocinas que possam estar a influenciar no perfil genético do parasita, não apenas na fêmea mas também no macho.

Os vermes obtidos de murganhos da estirpe  $TGF\beta RIIdn$  apresentaram maior variação provavelmente devido ao silenciamento da sinalização para TGF- $\beta$  fazendo com não haja expressão de *forkhead box P3* (Foxp3), proteína importante para o

desenvolvimento e funcionamento das células T reguladoras importantes para o estabelecimento da infecção. Osman et al. (2006), demonstraram que o silenciamento da expressão da TGF- $\beta$  de *S. mansoni*, SmT $\beta$ RII, resultaram na redução da expressão da proteína do canal ginecóforo (SmGCP) no macho afectando o desenvolvimento reprodutivo da fêmea e consequente produção de ovos. Segundo este autor, *S. mansoni* possui um receptor para esta citocina que se liga aos ligandos TGF- $\beta$  humano, o que providencia uma forte evidência da utilização dos ligandos do hospedeiro no crescimento e desenvolvimento do parasita, que mostrou-se activa nos tecidos sexuais.

Por outro lado, a presença de fragmentos nos perfis electroforéticos indicam o sucesso na amplificação e a ausência o oposto (Avisé, 2004), provavelmente resultantes da ocorrência de mutações naturais no sítio reconhecido pelo *primer* aplicado. Neste contexto, uma vez que a estirpe de *S. mansoni* em uso foi a mesma (estirpe BH) e o que variou foram apenas as condições imunológicas do hospedeiro definitivo, registou-se diferenças nos perfis electroforéticos dos vermes em análise, pode-se concluir que o sistema imunológico do hospedeiro definitivo pode contribuir para a ocorrência de pressão selectiva no perfil genético do parasita.

Os mecanismos moleculares envolvidos na interacção parasita-hospedeiro, são complexos e implicam uma conexão entre os sinais emitidos pelo hospedeiro durante a infecção e os receptores existentes no parasita em causa. Neste contexto, visto que foi demonstrado o papel da citocina TGF- $\beta$  no desenvolvimento e embriogénese de *S. mansoni* (Oliveira et al., 2012), é compreensível que esteja associada a imunossupressão quer seja por via inata ou adquirida, podendo ser inibida em humanos por razões imunológicas ou por imunossupressão, facto que pode auxiliar na compreensão do papel desta citocina na biologia de *S. mansoni* e aplicação do diagnóstico molecular na identificação de variações genéticas deste parasita em hospedeiros imunossuprimidos.

Oliveira et al. (2012), ao estudar o efeito da citocina TGF- $\beta$  humana (hTGF- $\beta$ ) na expressão do perfil do gene de vermes adultos de *S. mansoni* demonstraram por técnicas de PCR que esta citocina promovia a variação da expressão dos perfis dos genes dos vermes adultos ao descreverem mais de 300 genes do parasita cujo nível de expressão teria sido afectado pelo tratamento *in vitro* com hTGF- $\beta$ . Segundo estes autores, os genes

identificados estariam intimamente envolvidos na morfologia, desenvolvimento e ciclo celular de *S. mansoni*.

Por outro lado, as técnicas de amplificação do ADN além da alta sensibilidade e especificidade, trouxeram consigo uma nova abordagem no que diz respeito ao diagnóstico para o paciente, podendo-se utilizar material biológico obtidos por métodos menos invasivos e mais confortáveis, por exemplo no diagnóstico da leishmaniose visceral a partir da detecção de ADN de *Leishmania chagasi* circulante no sangue periférico em detrimento da convencional aspiração da medula óssea (Rey, 2010). Este cenário remete-nos à importância e necessidade do uso das técnicas moleculares, em particular a técnica RAPD que permite detectar através da análise de polimorfismos a ocorrência de possíveis mutações do agente em estudo.

Segundo Rey (2010), estas técnicas de PCR apesar caras em relação as técnicas de diagnóstico de rotina, com os avanços tecnológicos tendem a tornar-se baratos, sendo necessário considerar o custo-benefício de se utilizarem os métodos moleculares devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Embora saiba-se que a TGF- $\beta$  influencia na biologia de *S. mansoni*, poucas informações estão disponíveis sobre os genes que afectam o parasita no que diz respeito aos transcriptomas, pelo que seria importante realizar estudos mais detalhados sobre a biologia molecular deste parasita durante a infecção do hospedeiro definitivo.

Como forma de dar continuidade presente estudo, seria interessante realizar mais ensaios com estas estirpes obtidas de murganhos transgênicos, realizando mais passagens do ciclo parasita-murganho, para determinar se ao longo do tempo os polimorfismos identificados serão os mesmos. Por outro lado, poder-se-ia analisar as estirpes utilizadas para na manutenção do parasita em laboratório e avaliar parâmetros como a infectividade, o grau de patologia e a resistência à infecção. A sequenciação seria outra abordagem na interpretação dos polimorfismos genéticos, pelo que seria importante poder-se identificar com mais detalhes as características desses fragmentos polimórficos e quiçá identificar os potenciais genes alvos envolvidos nesses mecanismos moleculares durante a schistosomose.

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 5. Referências Bibliográficas

- Abe, L., Demenais, F. & Prata, A. (1991). Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Human Genetics*, 51, 206
- Ali, P. O., Simpson, A. J., Allen, R., Waters, A. P., Humphries, C. J., Johnston, D. A. et al. (1991). Sequence of a small subunit rRNA gene of *Schistosoma mansoni* and its use in phylogenetic analysis. *Molecular Biochemical Parasitology*, 46, 201-208.
- Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D. et al. (1992). Tumour necrosis factor  $\alpha$  restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*, 356, 604-607 .
- Araújo, A. M., Barbosa, G. H., Diniz, J. R., Malagueno, E., Azevedo, W. M., & Carvalho Junior, L. B. (1997). Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde as solid-phase in ELISA for schistosomiasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 39(3):155-1588.
- Arosa, F. A., Cardoso, E. M., & Pacheco, F. C. (2007). *Fundamentos de Imunologia*. Lisboa-Porto: Lidel - edições técnicas, Lda.
- Avise, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History And Evolution*. Springer Lda.
- Bardakci, F. (2000). *Random Amplified Polymorphic*. Sivas-TURKEY: Cumhuriyet University, Faculty of Arts and Science, Department of Biology.
- Barral, V., This P, I.-E. D., & Combes C., D. M. (1993). *Genetic variability and evolution of the Schistosoma genome analysed by using random amplified polymorphic DNA markers*. França: Centre de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, UCRA CNRS 698, University of Perpignan.

- Beall, M. J., & Pearce, E. J. (2001). Human transforming growth factor-beta activates a receptor serine/threonine kinase from the intravascular parasite *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Biology Chemistry*, 24;276(34):31613-31619.
- Belo, Silvana (2010a). *Diagnóstico das helmintoses: Métodos directos*. Texto de Apoio das aulas do IX Mestrado de Parasitologia Médica, Universidade Nova de Lisboa-IHMT.
- Belo, Silvana (2010b). *Diagnóstico de helmintoses: Execução do Método de Telemann-Lima*. XI Curso de Mestrado em Parasitologia Médica, Universidade Nova de Lisboa-IHMT.
- Belo, Silvana (2011). Aula: *Parasitas dos vasos sanguíneos/Helmintoses: Tremátodes do género Schistosoma*. XI Mestrado em Parasitologia Médica, UC Helminologia Médica II. Universidade Nova de Lisboa-IHMT
- Berriman, M., Haas, B. J., LoVerde, P. T., Wilson, R. A., Dillon, G. P., & Cerqueira, G. C. (2009). The genome of blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, 352-356.
- Black, C. L., Steinauer, M. L., Mwinzi, P. N., Secor, W. E., Karanja, D. M., & Colley, D. G. (2009). Impact of intense, longitudinal retreatment with praziquantel on cure rates of schistosomiasis mansoni in a cohort of occupationally exposed adults in western Kenya. *Tropical Medicine & International Health*, 14(4): 450–457.
- Botros, S., Pica-Mattoccia, L., & William, S. (2005). Effect of praziquantel on the immature stages of *Schistosoma haematobium*. *International Journal for Parasitology*, 35: 1452-1457.
- Braschi, S., Borges, W. C., & Wilson, R. A. (2002). Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 309-314.
- Cardoso, F. C., Macedo, G. C., Gava, E., Kitten, G. T., Mati, V. L., de Melo, A. L., et al. (2008). *Schistosoma mansoni* Tegument Protein Sm29 Is Able to Induce a Th1-Type of Immune Response and Protection against Parasite Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2, e308.

- Chiodini, P. L., Moody, A. H. & Manser, D. W. (2001). *Atlas of Medical Helminthology and Protozoology*. Londres: Elsevier Science.
- Chistulo, L., Loverde, P., & Engels, D. (2004). Focus: Schistosomiasis. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 12-13.
- Cimerman, B., & Cimerman, S. (2002). *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. São Paulo: 2ª edição, Atheneu.
- Cioli, D. (2000). *Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives?* *Current Opinion in Infectious Disease*, 13(6):659-663.
- Combes, C. (1990). *Where do human schistosomes come from? An evolutionary approach*. *Trends in Ecology Evolution*, 5:334-337.
- Combes, C., Leger, N., & Golvan, J. Y. (1975). Rats et Bilharziose en Guadeloupe. *Acta Tropica*, 32, 304-308.
- Cook, G., & Zumla, A. (2003). *Manson's Tropical Disease: Helminthic Infections-Schistosomiasis*. Londres: 21ª edição, Saunders.
- Dahle, G., Rahman, M., & Eriksen, A. G. (1997). RAPD fingerprinting used for discriminating among three populations of Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*). *Fisheries Research*, 32, 263-269.
- Davies, S. J., & McKerrow, J. (2003). Developmental plasticity in schistosomes and other helminths. *International Journal for Parasitology*, 33 (2003) 1277–1284
- De Araujo, E. S., Dos Santos, A. M., Areias, R. G., De Souza, S. R. & Fernandes, M. S. (2003). Uso de RAPD para a análise de diversidade genética em arroz. *Agronomia*, 37, 33-37.
- De Carli, G. A., Saraiva, P. J. & Issler, R. M. (1997). Infecções parasitárias e o hospedeiro imunocomprometido: diagnóstico laboratorial das enteroparasitoses. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 29, 24-28.

- Dias, N. E., de Souza, C. P., D., R., Katz, N. P. & Simpson, A. J. (1993). *The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of Schistosoma*. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil: Centro de Pesquisa Rene Rachou.
- Doenhoff, M. J. (1977). A role for granulomatous inflammation in the transmission of infectious disease: Schistosomiasis and tuberculosis. *Parasitology*, 115, S113-125.
- Fedmeier, H. & Poggensee, G. (1993). Diagnostic techniques in schistosomiasis control. A review. *Acta Tropica*, 52, 205-220.
- Fenwick, A. & Webster, J. P. (2006). Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. *Current Opinion of Infectious Diseases*, 19: 577-582.
- Franco, G. R., Valadão, A. F., Azevedo, V., & Rabelo, E. M. (2000). The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art. *International Journal for Parasitology*, 30 (2000) 453-463.
- Gentile, R., & Oliveira, G. (2008). Brazilian studies on the genetics of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*.
- Gotmisky, S. A., Kokaeva, G. Z., & Bobrova, K. V. (1999). Use of molecular marker for the analysis of plant. *Residence Journal Genetics*, 11, 1538-1549.
- Gryseels, B., Mbaye, A., De Vlas, S., Stelma, F., Guissé, F., Van Lieshout, L., et al. (2001). Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Tropical Medicine & International Health*, 6(11):864-873.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J. & Kesters, L. (2006). Human schistosomiasis. *Lancet*, 368, 1106-1118.
- Guerrant, R. L., Walker, D. H. & Weller, P. F. (2011). *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*. British: Saunders Elsevier.
- He, Y.-X., Salafsky, B., & Ramaswamy, K. (2001). Host-parasite relationships of *Schistosoma japonicum* in mammals hosts. *Trends in Parasitology*, 17, 320-324.



- Hillyer, G. V. (1974). Buoyant density and thermal denaturation profiles of schistosome DNA. *Journal of Parasitology*, 60, 725-727.
- Hove, R. J., Verweij, J. J., Vereecken, K., Polman, K., Dieye, L. & Lieshout, L. v. (2008). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 179-185.
- Huyse, T., Webster, B. L., Geldof, S., Stothard, J. R., Diaw, O. T., Polman, K. et al. (2009). Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. *PLO Pathogens*, 5, e1000571.
- Incaci, R. N., Morales, G. & Cesari, I. M. (2001). Parasite and vertebrate host genetic heterogeneity determine the outcome of infection by *Schistosoma mansoni*. Venezuela: Springer-Verlag.
- Karanja, D., Colley, D., Nahlen, B., Ouma, J. & Secor, W. (1997). Studies on schistosomiasis in western Kenya: I. Evidence for immune-facilitated excretion of schistosome eggs from patients with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus coinfections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56, 515-521.
- Katz, N. (1999). Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32: 705-711.
- Katz, N., & Almeida, K. (2003). Esquistossomose, Xistosoma, Barriga D'Agua. *Fapeming*, 38-41.
- Katz, N., & Dias, L. C. (1999). *Esquistossomose mansoni em parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. Atheneu.
- King, C. H. (2011). *Schistosomiasis*. In R. L. Gurrant, *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens & Practice* (pp. 848-853). Elsevier Saunders.

- Lee, J., Gun-He, K., Jae-Yong, P., Cheon-Seok, P., Dae Young, K., Jinkyu, L. et al. (2010). A RAPD-PCR Method for the Rapid Detection of *Bacillus cereus*. Korea: *Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Machado-Silva, J. R., Neves, R. H., da Silva, L. O., de Oliveira, R. M. & da Silva, A. C. (2005). Do mice genetically selected for resistance to oral tolerance provide selective advantage for *Schistosoma mansoni* infection?. Rio de Janeiro-Brasil: Elsevier.
- Mallavaey, T., Fontaine, J., Breuilh, L., Paget, C., Castro-Keller, A., Vendille, C. et al. (2007). Invariant and Noninvariant Natural Killer T Cells Exert Opposite Regulatory Functions on the Immune Response during Murine Schistosomiasis. *Infection and Immunity*, 75, 2171-2180.
- Manzella, A., Ohtomo, K., Monzawa, S. & Lim, J. (2008). Schistosomiasis of the liver. *Abdominal Imaging*, 33, 144-150.
- McManus, D. P. & Bowles, J. (1996). Molecular Genetic Approaches to Parasitic Identification: their Value in Diagnostic Parasitology and Systematics. *International Journal of Parasitology*, 26, 687-704.
- Meadows, H. M. & Simpson, A. J. (1989). Codon usage in *Schistosoma*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36, 291-293.
- Milhon, J. L. & Tracy, J. W. (1995). Updated codon usage in *Schistosoma*. *Experimental Parasitology*, 80, 353-356.
- Millach, S. C. (1997). *Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas*. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro.
- Mohamed, A. M., El-Din, A. T., Mohamed, A. H. & Habib, M. R. (2011). Identification of various *Biomphalaria alexandrina* strains collected from five Egyptian governorates using RAPD and species-specific PCR techniques. *American Journal of Molecular Biology*, 1, 17-25.

- Morgan, J. A., Dejong, R. J., Lwambo, N. J., Mungai, B. N., Mkoji, G. M., & Locker, E. S. (2003). First report of a natural hybrid between *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma rodhaini*. *Journal of Parasitology*, 416-418.
- Murray, C. J., & Lopez, A. D. (1996). *The Global Burden of Disease*. Harvard University Press.
- Museum, N. H. (n.d.). <http://www.nhm.ac.uk>. Retrieved Junho 19, 2012, from <http://www.nhm.ac.uk/>: <http://www.nhm.ac.uk>
- Neves, D. P., de Melo, A. L., Linardi, P. M., & Vitor, R. W. (2004). *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu.
- Oliveira, K. C., Carvalho, M. L., Verjovski-Almeida, S., & Loverde, P. (2012). Effect of human TGF- $\beta$  on the gene expression profile of *Schistosoma mansoni* adult worms. *Molecular Biochemical and Parasitology*, PMID; 22387759.
- Organization, W. H. (2009, Novembro 8). Retrieved Fevereiro 6, 2012, from Web site de WHO: <http://www.who.int.ent>
- Organization, W. H. (2010, Fevereiro). *Schistosomiasis*. Retrieved Outubro 11, 2011, from World Health Organization: [www.who.int](http://www.who.int)
- Ortega, C. D., Ogawa, N. Y., Rocha, M. S., Blasbalg, R., Caiado, A. H., Warmbrand, G., et al. (2010). Helminthic Diseases in the Abdomen: An Epidemiologic and Raiologic Overview. *RSNA*, 253-256.
- Osman, A., Niles, E., Verjovski-Almeida, S. & LoVerde, P. T. (2006). *Schistosoma mansoni* TGF-b receptor II: Role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene. *PLoS Pathogens*, 2(6):e54.DOI: 10.1371/journal.ppat.0020054.
- Rey, L. (2001). *Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. Rio de Janeiro: 3ª edição; Guanabara-Koogan.
- Rey, L. (2010). *Esquitossomíase Mansônica: O Parasito*. In L. Rey, Bases da Parasitologia Médica (pp. 169-170). Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

- Rollinson, D., Kaukas, A., Johnston, D. A., Simpson, A. J., & Tanaka, M. (1997). Some Molecular Insights into Schistosoma. *International Journal for Parasitology*, 27,11-28.
- Rollinson, D., Stothard, J. R., Jones, C. S., Lockyer, A. E., de Souza, C. P., & Noble, L. R. (1998). *Molecular Characterisation of Intermediate Snail Hosts and the Search for Resistance Genes*. Rio de Janeiro.
- Schewtz, J. (1955). Sur l'infestation naturelle des Rats domestiques (*Rattus rattus*) par *Schistosoma mansoni* en Afrique centrale. *Bulletin Social. Pathologie. Exot.*, 48, 182-185.
- Series, W. T. (2002). 912: *Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis*. Geneva: WHO.
- Short, R., Menzel, M. & Pathak, S. (1960). Somatic Chromosomes of *Schistosoma mansoni*. *Journal Parasitology*, 65:471-73.
- Silva, C. M., Gomes, E. P., da Silva, É. N., & Sertão, M. A. (2011). *Esquistossomose é tema de encontro internacional realizado pela Fiocruz*. Rio de Janeiro: Observatório Epidemiológico.
- Simpson, A. J., Sher, A. & McCutchan, T. F. (1982). The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. *Molecular Biochemical Parasitology*, 6(2):125-137.
- Sire, C., Durand, P., Pointier, J. P. & Théron, A. (1999). Genetic diversity and recruitment pattern of *Schistosoma mansoni* in a *Biomphalaria glabrata* snail population: a field study using random-amplified polymorphic DNA markers. *The Journal of parasitology*, 84: 227-235.
- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. 1973. *Numerical taxonomy*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Standley, C. J., Dobson, A. P. & Stothard, R. J. (2012a). Out of Animals and Back Again: Schistosomes as a Zoonosis in Africa. *InTech*, 209-223.

- Standley, C. J., Mugisha, L., Dobson, A. P. & Stothard, J. R. (2012b). Zoonotic schistosomiasis in non-human primates: past, present and future activities at the human-wildlife interface in Africa. *Journal of Helminthology*, Disponível em CJO doi: 10.1017/S0022149X12000028.
- Steinauer, M. L., Hanelt, B., Mwangi, I. N., Maina, G. M., Agola, L. E., Kinuthia, J. M. et al. (2008). Introgressive hybridization of human and rodent schistosome parasites in western Kenya. *Molecular Ecology*, 5062-5074.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M. & Utzinger, J. (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infectious Diseases*, 6(7):411-425.
- Stothard, J. R., Hughes, S., & Rollinson, D. (1998). Variation within the Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snails hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Acta Tropica*, 61(1): 19-29.
- Tran, M. H., Pearson, M. S., Bethony, J., Smyth, D., Jones, M., Duke, M. et al. (2006). Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nature Medicine*, 12, 835-840.
- Tsai, M.-H., Marx, K. A., Ismail, M. M., & Tao, L.F. (2000). Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Polymerase Chain Reaction Assay for Identification of *Schistosoma mansoni* Strains Sensitive or Tolerant to Anti-schistosomal Drugs. *Journal of Parasitology*, 86(1), 146-149.
- Uecker, M., Copetti, C. E., Poleze, L. & Flores, V. (2006). Infecções parasitárias: diagnóstico imunológico de enteroparasitoses. *RBAC*, 39(1): 15-19, 2007.
- van Dam, G. J., Wichers, J. H., Ferreira, T. M., Ghati, D., van Amerongen, A. & M., D. A. (2004). Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5458-5461.
- Vaz, A. J. (2001). *Diagnóstico imunológico das parasitoses*. In: DE CARLI, A. G. *Parasitologia Clínica: Seleção de métodos e técnicas para o diagnóstico das parasitoses humanas*. Atheneu, 505-539.

- Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E. A., Guimarães, P. E., Ojopi, E. P., Paquola, A. C. et al. (2003). Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature Genetics*, 35, 148-157.
- Webster, J. P., Shivastava, J., Johnson, P. J. & Blair, L. (2007). *Is host-schistosome coevolution going anywhere?* Londres: BioMed Central.
- WHO. (2002). *World Health Report*. Geneva: WHO.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição mundial da Schistosomose.....	6
<b>Figura 2:</b> Taxonomia <i>Schistosoma</i> sp. ....	8
<b>Figura 3:</b> Morfologia dos ovos de <i>Schistosoma</i> sp.....	9
<b>Figura 4:</b> Morfologia das formas larvares e adultas de <i>Schistosoma</i> spp. ....	10
<b>Figura 5:</b> Moluscos hospedeiros intermediários, morfologia das conchas .....	11
<b>Figura 6:</b> Risco de transmissão da schistosomose .....	12
<b>Figura 7:</b> Ciclo evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i> . ....	14
<b>Figura 8:</b> Exemplo de comportamento de risco .....	20
<b>Figura 9:</b> Obtenção do material biológico.....	26
<b>Figura 10:</b> Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS de estirpes de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	32
<b>Figura 11:</b> Nível de amplificação.....	33
<b>Figura 12:</b> Perfil de amplificação.....	34
<b>Figura 13:</b> Gel de agarose 1.5% usando OPI-3.....	35
<b>Figura 14:</b> Gel de agarose 1.5% usando OPI-7.....	36
<b>Figura 15:</b> Gel de agarose 1.5% usando OPI-12.....	36
<b>Figura 16:</b> Gel de agarose 1.5% usando OPI-18.....	37
<b>Figura 17:</b> Dendrograma de agrupamentos e distâncias genéticas entre estirpes de <i>S. mansoni</i> usando OPI-7.....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Marcadores RAPD-PCR utilizados e suas respectivas sequências de nucleótidos .....	29
<b>Tabela 2:</b> Lista dos <i>primers</i> e número de fragmentos para cada estirpe de <i>S. mansoni</i> .....	37



## **ANEXOS**

## **Anexo 1: Método de Teleman-Lima**

Este método permite a pesquisa e identificação de helmintas nas fezes e baseia-se na obtenção de uma emulsão com duas fases não miscíveis, uma aquosa e outra lipófila, que permite a separação das partículas fecais como parasitas, resíduos alimentares e bactérias (Belo, 2010b).

Para o efeito, emulsionou-se 20cm<sup>3</sup> de fezes, o equivalente a uma colher de café em água destilada. Filtrou-se a emulsão obtida através de duas espessuras de gaze, deitou-se o filtrado em tubos de centrífuga enchendo-os até um terço da sua altura. De seguida, juntou-se um volume igual de uma mistura feita com água e éter em partes iguais, tapa-se o tubo da centrífuga com uma rolha e agita-se bem. Levou-se a centrifugar a 1500rpm durante 2 minutos, decantou-se o sobrenadante e com uma pipeta de Pasteur retirou-se uma pequena porção do sedimento para uma lâmina de microscópio e colocou-se uma lamela. Examinou-se a preparação ao microscópio óptico.

## **Anexo 2: Método de Kato-Katz**

O método de Kato Katz- baseia-se no princípio de filtração, o que permite eliminar os constituintes fecais mais volumosos e posteriormente submetê-los ao processo de clarificação pelo método de verde malaquita-glicerina, o que permite contar os ovos de helmintas presentes na preparação (Belo, 2010b).

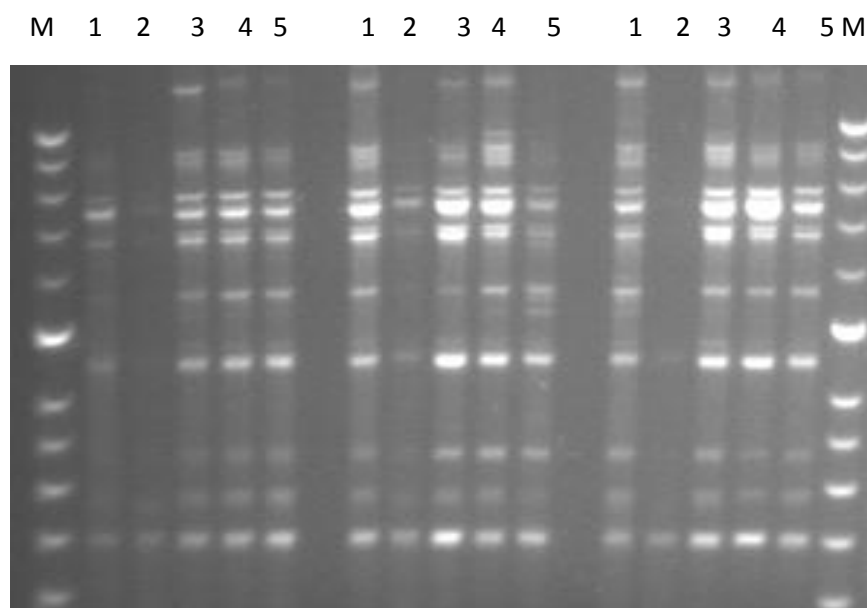
Em uma lâmina de microscópio colocou-se uma placa perfurada com um orifício central calibrado, 41,7mg e com uma espátula, retirou-se uma amostra de fezes e colocou-se sobre o papel absorvente. Com uma tira de gaze, comprimiu-se as fezes para que passasse pelos orifícios da gaze e com uma espátula recolheu-se uma pequena quantidade desta e depositou-se no orifício central da placa perfurada (sobre a lâmina de microscópio). Comprimiu-se até encher o orifício retirou-se a placa, de modo que ficasse um cilindro de matéria fecal sobre a lâmina; sobre este colocou-se uma tira de celofane embebida em verde de malaquita, comprimiu-se com a rolha de catchu, para que as fezes se distribuíssem uniformemente na lâmina. Deixou-se a preparação a temperatura ambiente

(12-24h) e examinou-se ao microscópio óptico contando os ovos encontrados. O resultado foi expresso multiplicando o número de ovos por 24, para ter o número de ovos por grama de fezes.

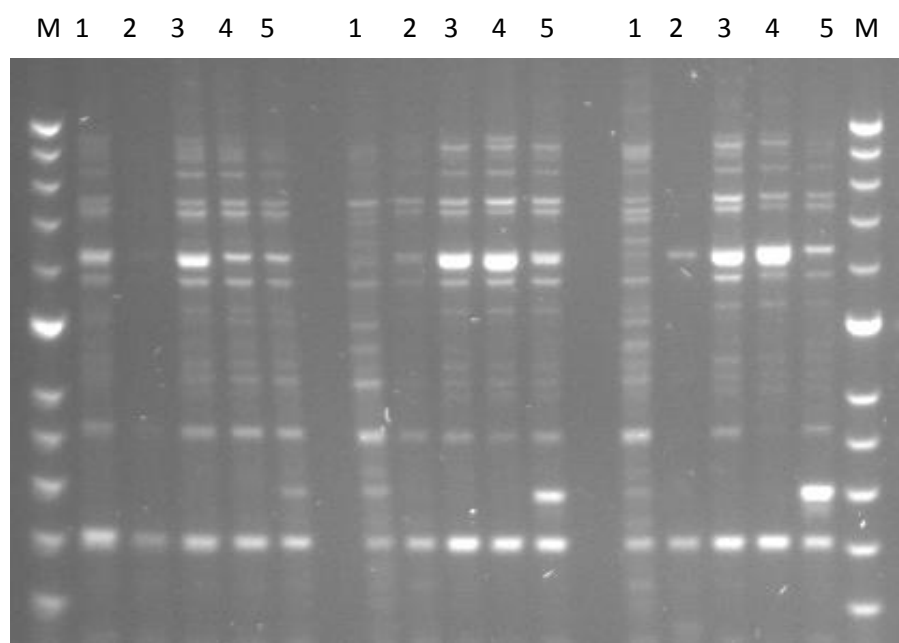
### **Anexo 3:** Géis de agarose 1.5% comparação de grupos

As amostras foram organizadas em grupos de fêmea, macho e *pool*. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem às estirpes BH, ER, C57BL/6J, J $\alpha$ 18 e TGF $\beta$ RIIdn respectivamente. O M corresponde ao marcador de 2000pb.

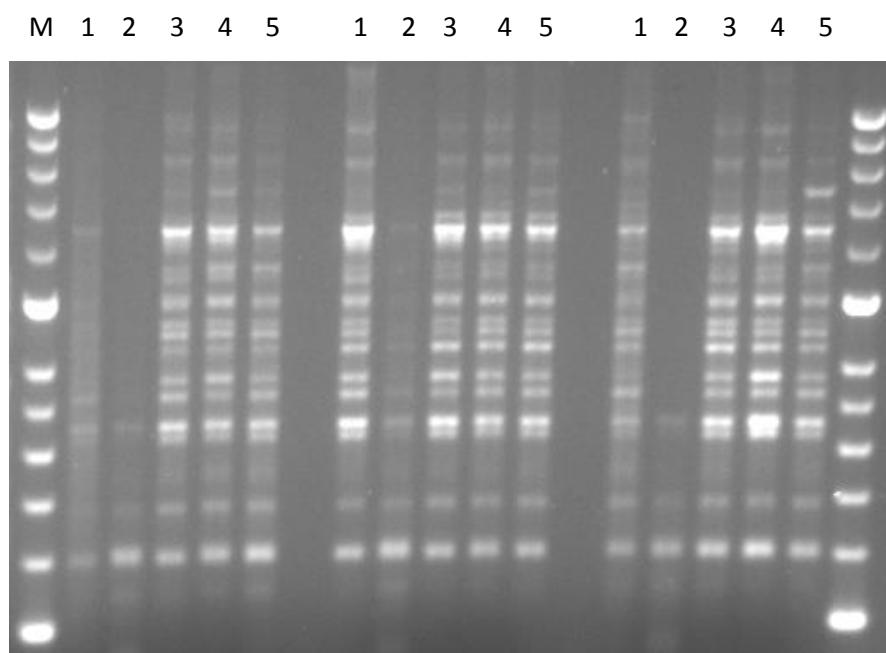
- **OPI-3**



- **OPI-7**



- **OPI-12**



- **OPI-18**

